

Ein invasives Neoplasma aus embryonalen
Zellen von *Drosophila melanogaster* in
Dauerkultur *in vivo*

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
VORGELEGT DER
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER
UNIVERSITÄT ZÜRICH
VON

Hans-Peter Hauri

Von Hirschthal AG
BEGUTACHTET VON
PROF. Dr. E. Hadorn

ZÜRICH 1974



Ein invasives Neoplasma aus embryonalen Zellen von *Drosophila melanogaster* in Dauerkultur *in vivo*

By HANS-PETER HAURI¹

*From the Zoologisch-vergleichend-anatomisches Institut
der Universität Zürich*

SUMMARY

*An invasive neoplasm from embryonic cells of *Drosophila melanogaster* cultured permanently in vivo*

The neoplasm H 126, obtained from the posterior half of a 6 ± 1 -h-old embryo of *Drosophila melanogaster*, was cultivated in adult female flies over more than 120 transfer generations (more than 4 years). Four sub-lines were derived from it.

The neoplasm H 126 invades the ovaries of the host flies, whereas the intestinal tract and the fat body are only surrounded very tightly, but not invaded by these abnormal cells. The neoplasm is lethal to the host 8–14 days after implantation into the abdomen (cultivation temperature: 25 °C).

Egg deposition of neoplasm-bearing hosts decreases 5 days after abdominal implantation.

After 4 years of cultivation the sub-lines differ specifically from one another in their chromosomal content; however, all of them show a karyotype near tetraploidy.

Ultrastructural features of these neoplasm cells are: (a) the nearly complete absence of membrane specializations correlated with weak cell adhesion, (b) the abundance of cytoplasmic processes and (c) 36 nm virus-like particles in the nucleus and in the cytoplasm.

Invasiveness, alterations of the karyotype, the origin of the neoplasm H 126, and the presence of virus-like particles are discussed.

EINLEITUNG

Bei *Drosophila* sind bis anhin nur wenige mit Vertebraten-Neoplasmen vergleichbare Gewebeneubildungen bekannt. Als nicht invasive (*benigne*) Neoplasmen sind dabei zu klassifizieren: (1) atelotypische Imaginalscheiben-Gewebelinien *in vivo* (Hadorn, 1969), (2) atelotypisches Gewebe aus 10 h alten Fragmenten von Wildtypembryonen (Gateff & Schneiderman, 1969) und (3) Imaginalscheiben der Mutante *l(2)gl⁴* (Gateff & Schneiderman, 1969). Als invasive (*maligne*) Gewebeneubildungen wurden beschrieben: (1) das Neuroblastom der Mutante *l(2)gl⁴* (Gateff & Schneiderman, 1969) und (2) ein aus Embryonen der Mutante *Notch⁸* erhaltenes Neoplasma (Gateff, 1971).

¹ *Author's address:* Zoologisch-vergleichend-anatomisches Institut der Universität Zürich, 8006 Zürich, Switzerland.

Das hier untersuchte abnorme Gewebe wurde bereits von Hadorn & Schubiger (1969) kurz beschrieben und seitdem weiterhin in Dauerkultur *in vivo* gehalten, insgesamt über mehr als 120 Transfergenerationen. Hadorn & Schubiger stellten fest:

(1) Das aus einer 6 ± 1 h (nach Eiablage) alten Hinterhälfte eines Wildtyp-embryos stammende Gewebe besteht aus schnell sich teilenden, nur locker assoziierten Zellen, die in Adultwirten kultiviert und auch in solche weitertransplantiert werden können.

(2) Das Gewebe ist invasiv: die Zellen dringen ins Wirtsovar ein. Darm und Malpighische Gefäße werden eng umgeben und 'angegriffen'.

(3) Das Gewebe ist für die weibliche Wirtsflye 10 bis 12 d nach Implantation letal (Zuchttemperatur 25°C).

(4) Das abnorme Blastem kann keine imaginalen Strukturen differenzieren. Wenn rücktransplantiert in verpuppungsreife Larven, tötet das Implantat den Wirt oder verschwindet während des Puppenstadiums. Nur wenige Implantate überstehen die Metamorphose, jedoch ohne dabei zu wachsen oder sich zu differenzieren.

(5) Der Karyotyp ist meist tetraploid, euploid und männlich.

Aufgrund der Befunde (1) bis (4) wurde dieses abnorme Gewebe als Neoplasma bezeichnet.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind: (1) Licht- und elektronenoptische Untersuchungen mit besonderer Berücksichtigung von Zellkontakt, Invasivität und Feinbau der Neoplasmazellen. (2) Das Verhalten des Zellverbandes in Dauerkultur *in vivo*.

MATERIAL UND METHODEN

1. *Entstehung.* Beim Versuch, Dauerkulturen ausgehend von Fragmenten von 6 ± 1 h alten *Drosophila*-Embryonen (Wildstamm Sevelen) zu erhalten, wurde das hier beschriebene Neoplasma H 126 (H = Hinterhälfte eines Embryos, 126 = Nummer des Versuches) nach 15 d *in vivo* Kultur im Abdomen eines weiblichen Adultwirtes (Wildstamm Sevelen) gefunden.

2. *Transplantation.* Das so erhaltene Gewebe wurde mit der Technik von Hadorn (1963) in weiblichen Adultfliegen (Hadorn & Garcia-Bellido, 1964) kultiviert, und zwar durchwegs in 1 bis 2 d alten Imagines. Eine Transfergeneration dauerte jeweils 14 d bei einer Zuchttemperatur von 18°C bzw. 8 bis 12 d für die Sublinie 1b_{25°}, die bei 25°C gehalten wurde. Aus der ursprünglichen Gewebelinie H 126 ergaben sich 4 Sublinien (Abb. 1).

3. *Histologie.* Wirtstieren mit einem zehntägigen abdominalen Neoplasma-implantat trennte ich in Bouin'scher Fixierlösung mit Wolframnadeln oder einer Rasierklinge das Abdomen unmittelbar hinter dem Thorax ab. Entsprechend fixiert wurden Fliegenköpfe mit einem gleich lang gewachsenen Neoplasma-implantat in der Kopfkapsel. Um hier ein gutes Eindringen der Fixierflüssigkeit zu gewährleisten, bewährte es sich, die Antennen an der Basis wegzuschneiden.

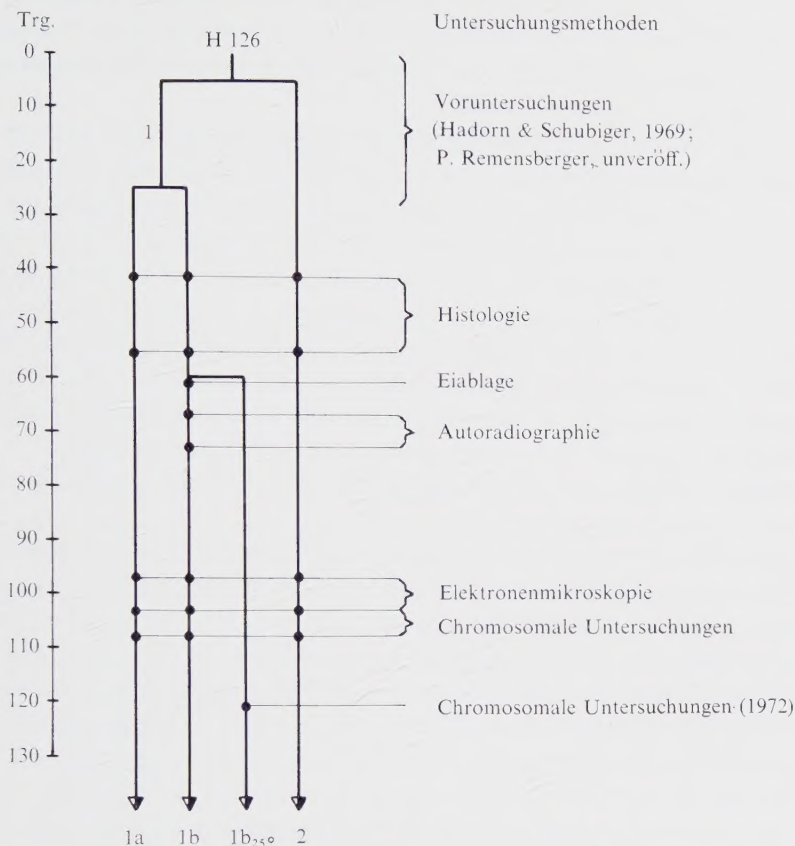


Abb. 1. Aufspaltung der neoplastischen Stammlinie H 126 in die Sublinien 1a, 1b, 1b₂₅₀ und 2 mit zeitlichem Ablauf der Untersuchungsmethoden. Trg = Transfer-generation.

Nach Fixation und Auswaschen in 70 % Aethanol wurde entwässert und in Paraplast eingebettet. Vollständige Schnittserien von 4 μ m Dicke färbte ich anschliessend mit Hämatoxylin nach Weigert (zum Teil gegengefärbt mit Eosin), Toluidinblau und Azan. Photographiert wurde mit einem Zeiss Photomikroskop.

4. **Autoradiographie.** 8 d alte Wirtstiere (mit 7-d Neoplasmaimplantat in der Leibeshöhle, Zuchttemperatur 25 °C), die aufgrund ihres stark angeschwollenen Abdomens maximal 2 bis 3 d vor dem Tod standen, erhielten eine dreimalige ³H-Thymidin-Injektion von der Konzentration 10 μ Ci/g Körpergewicht mit einer Injektionsmaschine (Baumann, 1969) im Abstand von je 3 h. 22 h nach der ersten Injektion wurde das Abdomen mit dem Implantat vom Thorax abgetrennt und in Bouin'scher Lösung fixiert. 4 μ m Paraplastschnitte wurden nach konventioneller Strippingfilm-Methode für die autoradiographische Untersuchung behandelt (Expositionszeit: 1–3 Wochen bei 4 °C). Nach dem

Entwickeln wurden die Schnitte mit Hämalaun nach P. Mayer (Romeis, 1968) gefärbt. Als Kontrolle verwendete ich 8 d alte Adulttiere ohne Neoplasma-implantat, denen die gleiche ^3H -Thymidin-Injektion und die gleiche autoradiographische Behandlung zuteil wurde.

5. *Eiablage*. 1 d alte virginelle Weibchen wurden mit je gleich grossen Neoplasma-stücken von *ca.* $(100\ \mu\text{m})^3$ versetzt und mit je 2 Männchen in Einzelzucht gehalten in 10 cm langen Plastikröhrchen mit 18 mm Innendurchmesser. Auf der einen Seite bildete ein hohler Plastikzapfen mit eingefülltem Standardfutter (Mais, Agar, Zucker, Hefe) den Abschluss, auf der anderen Seite ein Schaumgummistopfen. Auf die Hefe wurde noch ein mit 1 %-iger Essigsäure durchtränktes, schwarzes, rauhfälliges Papierscheibchen (Durchmesser 10 mm) gelegt, um die Eiablage zu begünstigen und das Auszählen zu erleichtern. Ein- bis zweimal pro Tag zählte ich die abgelegten Eier und verglich ihre Anzahl mit derjenigen von Kontrolltieren, die anstatt eines Neoplasmastückes nur eine Insektenringer-Injektion erhalten hatten. Bei jeder Zählung wurde das Futter erneuert.

6. *Chromosomenuntersuchungen*. Nach der Methode von Lewis & Riles (1960) und Remensberger (1968) wurden Mitosen von Neoplasmazellen mit Colcemid angereichert und orceingefärbte Quetschpräparate hergestellt, die sich als Dauerpräparate verwenden lassen, wenn man das Deckglas nach dem Quetschen zum Luftabschluss randlich mit farblosem Nagellack umgibt. Ein so behandeltes Präparat hält sich sicher ein Jahr. Schon nach wenigen Tagen ist allerdings ein schwaches Ausbleichen der gequetschten Zellen feststellbar, was sich aber nicht nachteilig auswirkt, wird doch dadurch der Kontrast zwischen Chromosomen und Zytoplasma erhöht. Auch scheint dieses Ausbleichen nach *ca.* einer Woche nicht mehr merklich fortzuschreiten. Die Analyse der ausgebreiteten Chromosomensätze erfolgte mittels Phasenkontrast ($1000\times$, Olympus), die Photographien in einem Photomikroskop (Zeiss Ultraphot II, $1250\times$, Phasenkontrast).

7. *Elektronenmikroskopie*. Kurz vor dem Tod stehende Wirtstiere mit Neoplasmaimplantaten wurden in 75 % Aethanol bis zur Bewegungslosigkeit betäubt, danach kurz in Ringer gespült und in die Fixierlösung (1,5 ml Acrolein 99 %; 3,0 ml Glutaraldehyd 25 %; 42,5 ml Cacodylatpuffer 0,05 M, pH 7,3) überführt. Im Fixativ trennte ich mit einer Rasierklinge das Abdomen mit dem Implantat vom Thorax ab und liess es nach Entfernen des Kropfes 1 h bei Zimmertemperatur im Fixativ. Nach anschliessendem mehrmaligem Auswaschen während 2 h in Cacodylatpuffer (0,05 M, pH 7,3 mit 10 % Saccharose) wurde für 4 h in 1 % OsO_4 (1 Teil OsO_4 2 % und 1 Teil Cacodylatpuffer, 0,05 M, pH 7,3 mit 10 % Saccharose) nachfixiert. Nach erneutem mehrmaligem Auswaschen in Cacodylatpuffer für 50 Min. gelangten die Abdomina via Alkoholreihe und Propylenoxyd in Araldit. Die Schnitte wurden auf einem LKB-Ultramikrotom hergestellt, anschliessend mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert und mit einem Elektronenmikroskop (Hitachi HS 8) untersucht.

RESULTATE

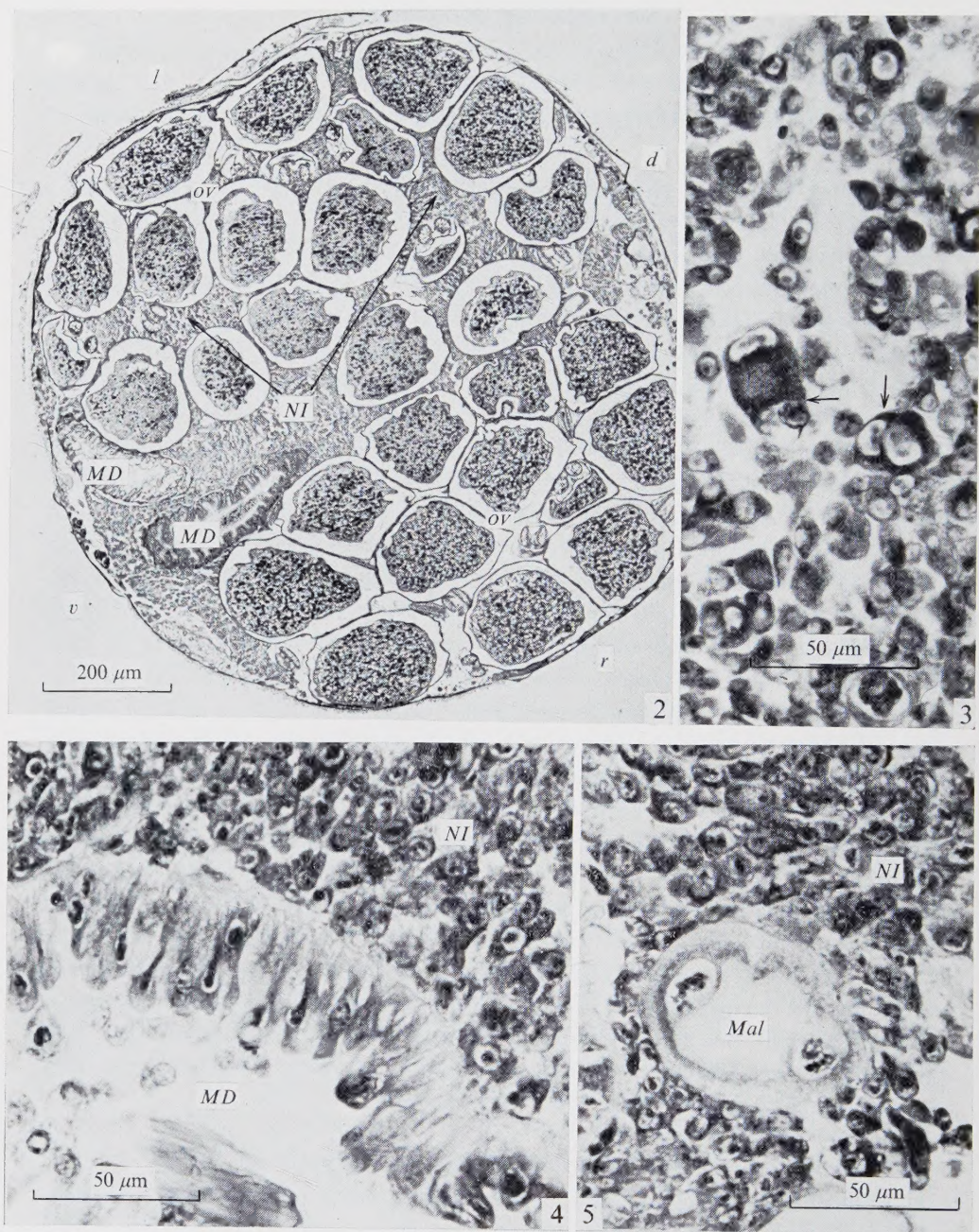
I. *Generelle Charakteristika des embryonalen Neoplasmas H 126 in der 39. Transfergeneration*

Das hier untersuchte Neoplasma H 126 übernahm ich in der 39. Transfergeneration. Es galt nun vorerst zu überprüfen, ob die von Hadorn & Schubiger (1969) gemachten Feststellungen immer noch zutreffen:

In allen Sublinien war eine unvermindert starke Zellproliferation festzustellen. Das Gewebe bestand aus einem derart lockeren Zellverband, dass bei der Sektion gelegentlich grössere Bereiche des Implantates in Einzelzellen oder wenigzellige Assoziationen zerfielen. Interessanterweise konnte sich die Gewebekonsistenz von einer Transfergeneration auf die andere sichtbar verändern. Konsistentere Implantate zeigten oft mehr eingewachsene Wirtstracheen als weniger konsistente. Das ins Abdomen adulter Fliegen implantierte Neoplasma drang in die Wirtsovarien ein. Darm und Malpighische Gefässe wurden vielfach so eng umschlossen, dass mittels Wolframnadeln nicht alles Implantatsmaterial vom Verdauungstrakt abgelöst werden konnte. Auch zu den übrigen abdominalen Wirtsorganen bestand eine Affinität, die oft stärker war als die Kohärenz der Neoplasmazellen untereinander. Die Letalität der Wirte war mit 8 bis 14 d (Zuchttemperatur 25 °C) nach Implantation eines Neoplasmastückes von $ca. (100 \mu m)^3$ in dessen Abdomen unverändert geblieben. Solche Fliegen fielen schon mindestens 2 d vor Todeseintritt infolge verminderter Aktivität auf und zeigten durch Hämolymphe stark angeschwollene Abdomina ('bloating syndrome', Gateff & Schneiderman, 1969). Wegen des hohen Hämolymphe-Innendruckes konnte der Rüssel bald nicht mehr eingezogen werden. Die so aufgeblähten Wirtsfiegen verendeten im Futter oder blieben an der Glaswand des Futtertübchens kleben. Die Sektion unmittelbar vor dem Tod stehender Fliegen zeigte ein mindestens 150- bis 200-fach gewachsenes Implantat. Zur Blähung des Abdomens trug aber auch die im Übermass angereicherte Hämolymphe bei. In bezug auf Wachstum, Morphologie und Wirtstod war also keine Veränderung des Neoplasmas nach 39 Transfergenerationen feststellbar. Auch das 'bloating syndrome' hatte sich bereits in der ersten Transfergeneration manifestiert (E. Hadorn, persönliche Mitteilung).

II. *Histologische Beschreibung des Neoplasmas H 126*

Das Neoplasma besteht aus runden bis leicht ovalen, selten schwach spindelförmigen Zellen. Unter Berücksichtigung einer Schrumpfung von $ca. 20 \%$, verursacht durch Fixation und Entwässern (Romeis, 1968), lassen sich Zelldurchmesser von $5,5 \mu m$ bis $30 \mu m$ und entsprechende Kerndurchmesser von $4 \mu m$ bis $20 \mu m$ bestimmen. Mehr als die Hälfte der Zellen zeigt einen Längsdurchmesser zwischen $8 \mu m$ und $14 \mu m$. Die Zellkerne tragen einen grossen, runden bis lappigen Nukleolus (Abb. 3). Gelegentlich ist das Implantat von einzelnen Fettzellen durchsetzt. Der Zellkontakt ist vor allem an der Peripherie



ABBILDUNGSTEXTE 2-5

Abb. 2. Querschnitt durch das Abdomen eines Adultwirtes mit Neoplasma H 126-Implantat (NI), das zwischen die Ovariolen des linken Ovars (OV) eingedrungen ist (Pfeile) und Mitteldarmschlingen (MD) eng umschliesst. Das rechte Ovar ist nicht befallen. *d* = dorsal, *v* = ventral, *l* = links, *r* = rechts. Azanfärbt.

Abb. 3. Lockerer Verband von Neoplas mazellen H 126 mit mindestens zweiker-nigen Zellen (Pfeile). Man beachte die grossen Nukleolen. Toluidinblau-Färbung.

Abb. 4. Enger Kontakt zwischen Neoplas maimplantat (NI) und Mitteldarm (MD) des Adultwirtes. Weigert Hämatoxylin-Färbung.

Abb. 5. Enger Kontakt zwischen Neoplas maimplantat (NI) und Malpighischem Gefäss (Mal) des Adultwirtes. Weigert Hämatoxylin-Färbung.

Tab. 1. *Invasionshäufigkeit des Neoplasmas H 126 in die Wirtsovarien anhand von Schnittpräparaten. (Wirtsfliegen mit 10- bis 12-d Neoplasmaimplantat)*

Mit invadiertem Neoplasma	Anzahl Tiere
beide Wirtsovarien	19 (15*)
nur ein Wirtsovar	7
kein Wirtsovar	2
Total	28

* Eines der beiden Ovarien ist jeweils stärker betroffen.

des Implantates gering bis fehlend, währenddem zentral liegende Zellmassen kohärenter erscheinen, insbesondere solche, die ins Ovar eingedrungen sind. Anderseits findet man gelegentlich Zellpaare in sehr engem Kontakt wie auch zweikernige (Abb. 3), seltener mehrkernige Zellen. Das Neoplasma zeigt keine Anzeichen einer inneren Gliederung.

III. Invasion und Wirtsschädigung

Ob ein Neoplasma invasiv ist, und inwiefern es dadurch seinen Wirt schädigt, ist ein entscheidendes Kriterium für dessen Klassifizierung.

1. Invasion in Ovarien

(a) *Histologische Schnitte.* Diese zeigen, dass die Neoplas mazellen die dünne peritoneale Schicht, welche die Ovarien umgibt, durchdringen können und zwischen den Ovariolen so stark proliferieren, dass diese auseinandergedrückt werden (Abb. 2). Die Neoplas mazellen dringen jedoch nie in den ovariolaren Hohlraum ein. Aus Tab. 1 geht hervor, dass die Neoplas mazellen nicht immer in beide Wirtsovarien eindringen: Sind beide Ovarien betroffen, dann ist meist ein Ovar stärker befallen und zwar durchwegs das der Implantationsstelle näherliegende. Aus dem stärker befallenen Ovar können offenbar auch weniger Eier abgelegt werden als aus dem schwach befallenen Ovar, ist es doch durchwegs grösser und enthält mehr ausgewachsene primäre Oocyten. Ist nur ein Ovar befallen, so ist dieses wiederum weniger entleert. In den beiden Fällen ohne Invasion ist das eine Neoplasmaimplantat nur wenig, das andere aber für diese Proliferationsdauer normal gewachsen.

(b) *Eiablage von Neoplasmatieren.* Aufgrund der histologischen Untersuchungen ist anzunehmen, dass das invasive Neoplasmaimplantat eher die Eiablage als die Eiproduktion behindert. Tab. 2 zeigt, dass die Eiablage schon um 122 h nach Implantation eines Gewebefragmentes von ca. $(100 \mu\text{m})^3$ Grösse entscheidend abnimmt, also noch bevor sich äussere Aktivitätsverminderungen oder das 'bloating syndrome' manifestieren.

Tab. 2. Eiablage von 18 Adultweibchen, denen 1 d nach dem Schlüpfen ein Neoplasma H 126 – Gewebestück implantiert wurde (Neoplasmatiere), im Vergleich zur Eiablage von 19 1-d Weibchen nach Ringerinjektion (Ringerkontrolle)

h nach Implantation bzw. Injektion	Anzahl abgelegter Eier $m \pm s$	
	Neoplasmatiere	Ringerkontrolle
24	11,06 $\pm$ 1,55	17,32 $\pm$ 2,60
46	50,33 $\pm$ 2,87	54,79 $\pm$ 3,72
58	29,39 $\pm$ 2,27	32,58 $\pm$ 1,74
75	46,11 $\pm$ 1,89	50,26 $\pm$ 2,67
98	50,78 $\pm$ 3,14	58,89 $\pm$ 2,77
122	36,00* $\pm$ 3,22	51,79* $\pm$ 2,99
147	29,83 $\pm$ 3,99	54,89 $\pm$ 3,11
181	18,82 $\pm$ 4,22	57,89 $\pm$ 3,64
199	3,50 $\pm$ 1,00	24,95 $\pm$ 2,14
216	1,33 $\pm$ 0,76	22,16 $\pm$ 1,99
238	1,00 $\pm$ 0,63†	27,58 $\pm$ 2,55
263	0,83 $\pm$ 0,83‡	25,77 $\pm$ 3,30

m, mittlere Eizahl mit standard error (s).

* im t-Test sind diese Mittelwerte signifikant verschieden ($P < 1\%$).

† nur 12 Tiere leben noch.

‡ nur 6 Tiere leben noch.

2. Invasion in Darm und Malpighische Gefäße?

(a) *Histologische Schnittserien* angefärbt mit Toluidinblau und Hämatoxylin nach Weigert zeigen einen sehr engen Kontakt zwischen Neoplasmagewebe und Verauungstrakt (Abb. 4 und Abb. 5). Azangefärbte Präparate, bei denen das Bindegewebe des Darmes scharf blau angefärbt ist, was einen guten Kontrast zu den rot bis orange angefärbten Neoplas mazellen ergibt, zeigen – im Gegensatz zu Hadorn & Schubiger (1969) – nie eine gesicherte Invasion dieser Zellen in Darm oder Malpighische Gefäße.

(b) *Autoradiographie*. Als weitere Methode zur Abklärung einer möglichen Invasion von Neoplas mazellen in den Darmkanal wurde die radioaktive Zellmarkierung mit ^3H -Thymidin gewählt. Weil die Neoplas mazellen vom Zeitpunkt der Implantation an mehrere Zellteilungen durchlaufen, bis sie mit den abdominalen Wirtsorganen in engen Kontakt treten, musste von der Markierung des neoplastischen Zellmaterials vor dessen Implantation verzichtet werden. Da bei verschiedenen Insekten nur noch sehr wenige Zellen des adulten Mitteldarmes DNS synthetisieren (Krishnakumaran, Berry, Oberlander & Schneiderman, 1967), sollte direkt ins Wirtsabdomen injiziertes ^3H -Thymidin vorwiegend die rasch sich teilenden Neoplas mazellen markieren, nicht aber die Darmzellen und so eine mögliche Zellinvasion erkennen lassen.

In einem Kontrolllexperiment wurde zuerst abgeklärt, wieviel ^3H -Thymidin von den abdominalen Adultorganen inkorporiert wird. Tab. 3 zeigt die Resultate

Tab. 3. ^3H -Thymidin-Markierung in verschiedenen Geweben von 8-d Adulttieren ohne Neoplasmaimplantat (Kontrolle)

Gewebe	Markierung
Mitteldarm	
mittlerer	+
hinterer	±
Pylorusregion	±
Intestinum anterior	—
Rectum	—
Malpighische Gefässe	— (ausser kurz vor Einmündung in den Pylorus, wo wenige Zellen markiert sind)
Fett	±
Epidermis	— (ausser mehreren markierten Zellen um Injektionsstelle)
Ovar	++
	++ , mehr als 15 % der Kerne sind markiert.
	+ , 10–15 % der Kerne sind markiert.
	± , weniger als 10 % der Kerne sind markiert.
	— , keine markierten Kerne.

nach ^3H -Thymidin-Injektion in 8 d alte adulte Weibchen von *Drosophila* ohne Neoplasmaimplantat: Die Endothelzellen des Mitteldarmes sind vor allem im mittleren Bereich noch relativ stark markiert, währenddem *Intestinum anterior* und *Rectum* keine markierten Zellen aufweisen.

^3H -Thymidin-Injektion in 8 d alte adulte Weibchen mit 7 d altem Neoplasmaimplantat: Diese Tiere standen kurz vor dem Tod, denn sie zeigten schon starkes 'bloating', weil ihnen besonders grosse Neoplasmastücke implantiert worden waren. Autoradiographische Präparate ergaben ca. 20 bis 50 % markierte Neoplasmazellen, wobei isolierte, wenigzellige Gruppen und peripher liegende Zellen vermehrt markiert waren als Zellen im zentralen Bereich des Implantates. Dieser Effekt beruht nicht etwa darauf, dass das ^3H -Thymidin nicht in diese zentralen Implantationsbereiche eindringen kann, denn die zentral liegenden Ovariolen waren durchwegs stark markiert. Deshalb darf angenommen werden, dass das Neoplasmaimplantat im peripheren Bereich stärker proliferiert als im zentralen. Die Markierung des Darmtraktes entsprach derjenigen der Kontrolle. Somit kann wenigstens im Bereich des *Intestinums anterior* und des *Rectums* eine Invasion von Neoplasmazellen ausgeschlossen werden und zwar auch eine Einzelzellinvasion. In der Region des Mitteldarmes ist es anhand dieser autoradiographischen Befunde nicht möglich, eine Einzelzellinvasion auszuschliessen.

3. *Neoplasma H 126 und Fettgewebe*

Das abdominale Fettgewebe von Neoplasma Wirten ist gegenüber Kontrolltieren reduziert und wird vom Implantat eng umschlossen, wobei einzelne Neoplasmazellen gelegentlich zwischen den locker assoziierten Fettzellen gefunden werden.

4. *Invasion ins Hirn?*

Adulte Weibchen, denen ein *ca.* $(100\ \mu\text{m})^3$ grosses Neoplasmastück durch das *Occiput* in die Kopfkapsel implantiert worden war, starben nach 7 bis 14 d (Zuchttemperatur 25 °C), also nach der gleichen Zeit wie Wirte mit abdominalem Implantat. Tiere mit einem Implantat in der Kopfkapsel wurden nach 8 bis 10 d dauernder Proliferation fixiert und histologisch untersucht. Paraplastschnitte zeigen, dass das implantierte Neoplasma meist jeden freien Platz in der Kopfkapsel ausfüllt. Hirn und *Oesophagus* werden eng umschlossen. Der *Oesophagus* wird selbst beim engen Durchtritt durchs Hirn gelegentlich noch von Neoplasmazellen umgeben. Histologisch lässt sich aber keine eindeutige Schädigung von Hirn und *Oesophagus* feststellen. Solche Tiere können aber schon mehrere Tage vor dem Tod ihren Rüssel wegen des grossen Hämolyphinnendruckes nicht mehr einziehen.

IV. *Chromosomale Untersuchungen*

1. *Voruntersuchungen*

In der 6. bis 8. Transfargeneration (84 bis 112 d) wurden von P. Remensberger (unveröff.) bereits chromosomale Untersuchungen durchgeführt. Orceingefärbte Quetschpräparate ergaben, dass das Neoplasma zu 18 % aus diploiden, 58 % aus tetraploiden und 24 % aus okto- und höherploiden Zellen bestand (Tab. 4). Von diesen untersuchten Mitosen wurden alle diploiden und tetraploiden Sätze als sicher euploid bezeichnet. Von den oktoploiden konnten immerhin noch 5 von 24 als sicher euploid angesprochen werden. Sublinie 1 und Sublinie 2 unterschieden sich chromosomal noch nicht. Fast alle Chromosomensätze waren männlich. Demnach stammt das Neoplasma H 126 offenbar aus einem männlichen Embryo.

2. *Untersuchungen nach 4-jähriger Kulturdauer in vivo*

Zur Überprüfung der chromosomalen Konstanz der einzelnen Sublinien wurden nach 4-jähriger Kulturdauer wiederum anhand von orceingefärbten Quetschpräparaten Mitosen analysiert.

Sublinie 1a (Abb. 6A–C; Tab. 4). Diese Sublinie zeigt vorwiegend hypotetraploide Chromosomensätze, wobei die kreuzförmig erscheinenden zweiten und dritten Chromosomen durchwegs in vollständiger Zahl (total 8) vorhanden sind. Die vierten Chromosomen sind oft ebenfalls vollständig (Abb. 6A). Unregel-

Tab. 4. Verteilung der Polidiegrade in den 4 Sublinien des Neoplasmas H 126 nach 4-jähriger Kulturdauer im Vergleich zu derjenigen in der 6. bis 8. Transfergeneration (P. Remensberger, unveröf.)

Ploidiegrad*	Anzahl Chromosomensätze				
	Sublinie 1 und 2 Trg 6-8 (P. Remens- berger)	Sublinie 1a Trg 103-108	Sublinie 1b Trg 103-108	Sublinie 2 Trg 103-108	Sublinie 1b _{25°} Trg 121
2n	27	1	1	0	0
4n-2	0	12	0	2	0
4n-1	0	24	0	3	47
4n	90	0	0	111	2
4n+1	0	0	2	1	0
4n+2	0	0	45	0	0
4n+3	0	0	3	0	0
ca. 4n†	0	11	14	0	11
8n	24	4	3	11	9
> 8n	13	2	2	1	2
Total	154	54	70	129	71

* In dieser Aufstellung wurden die vierten Chromosomen als vollständig vorhanden angenommen.

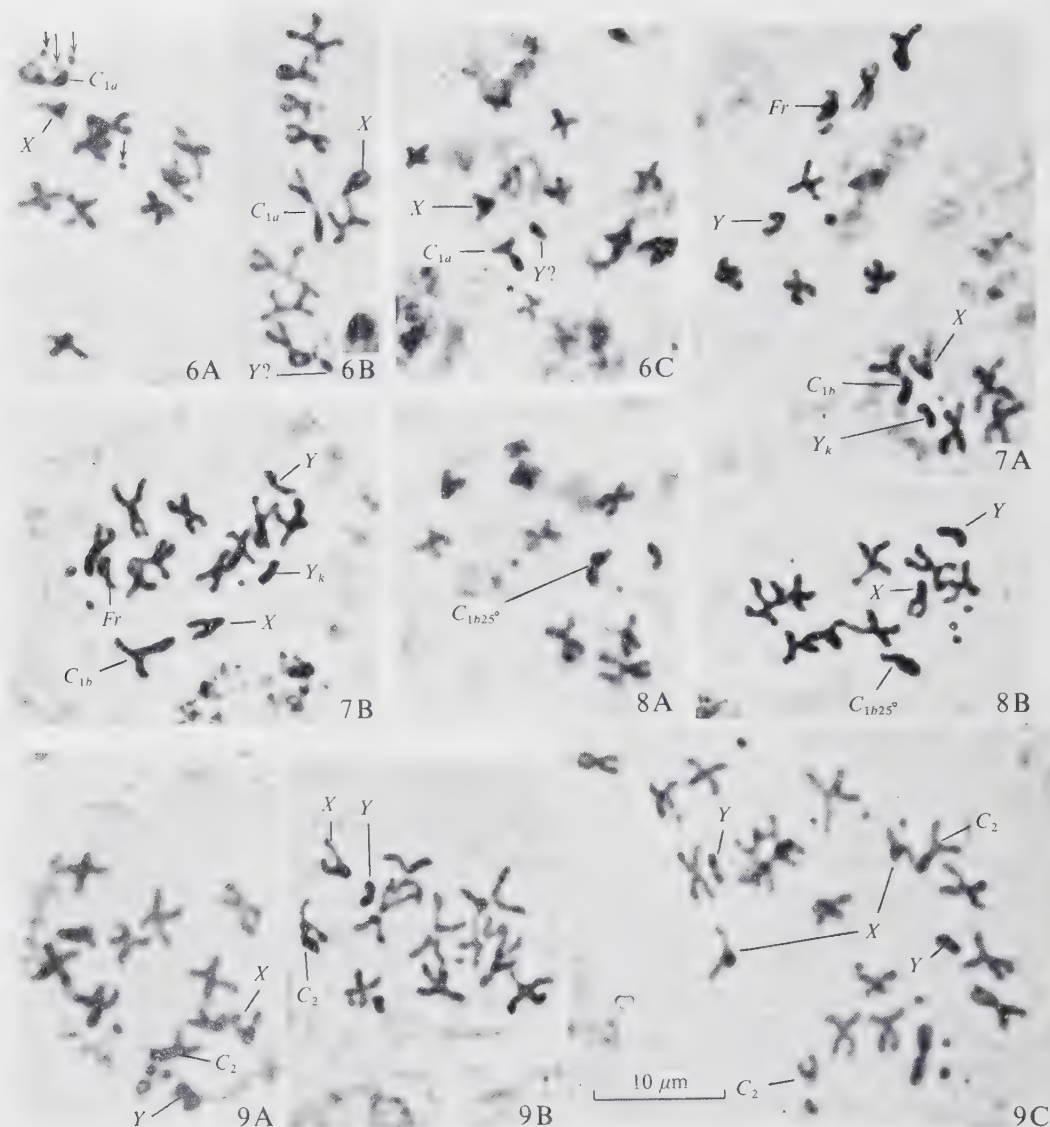
† Nicht genau analysierbar, aber im Rahmen der jeweiligen Sublinie.

Trg, Transfergeneration.

mässigkeiten ergeben sich in bezug auf die Geschlechtschromosomen: Bei allen Sätzen ist nur ein typisches X-Chromosom erkennbar. In 24 Fällen ist kein typisches Y-Chromosom vorhanden, an seiner Stelle aber ein kurzstabförmiges heterochromatisches (vgl. Diskussion) Fragment ($4n-1$, Tab. 4; Abb. 6A-C), möglicherweise ein Y-Chromosomenfragment. In 12 Fällen ($4n-2$, Tab. 4; Abb. 6A) ist weder ein typisches Y-Chromosom, noch ein entsprechendes Fragment vorhanden. Allen Chromosomensätzen ist ein ypsilonförmiges, atypisches Chromosom gemeinsam, das als C_{1a} bezeichnet wird. Der einzige diploide Satz ist weiblich und somit einer Wirtszelle zuzuschreiben.

Sublinie 1b (Abb. 7A-B). Diese Chromosomensätze sind hauptsächlich hypertetraploid ($4n+2$, Tab. 4). Es sind total 9 grosse metazentrische Autosomen vorhanden. Von den Geschlechtschromosomen sind jeweils nur ein X- und ein Y-Chromosom typisch. Ein zweites Y-Chromosom ist verkürzt. Wie in Sublinie 1a ist auch hier ein atypisches, ypsilonförmiges Chromosom vorhanden (C_{1b}), dazu noch ein unbekanntes Fragment, das nicht immer in gleicher Form erscheint. Die vierten Chromosomen sind in zwei- bis vierfacher Anzahl vorhanden. Der einzige diploide Satz ist nicht sicher auf sein Geschlecht ansprechbar.

Sublinie 1b_{25°} (Abb. 8A-B). Diese Sublinie unterscheidet sich von ihrer



ABBILDUNGSTEXTE 6-9

Abb. 6. Hypotetraploide Chromosomensätze der Sublinie 1a. (A) Satz ohne Y-Chromosom. Die vierten Chromosomen sind in vierfacher Zahl vorhanden (Pfeile). (B, C) Sätze mit einem Chromosomenfragment ($Y?$), möglicherweise einem Y-chromosomalen Bruchstück. C_{1a} = ypsilonförmiges, atypisches Chromosom, X = X-Chromosom. Colcemidbehandelt und orceingefärbt.

Abb. 7. (A, B) Hypertetraploide Chromosomensätze der Sublinie 1b. C_{1b} = ypsilonförmiges, atypisches Chromosom, Fr = nicht zu identifizierendes Fragment, X = X-Chromosom, Y = normales Y-Chromosom, Y_k = verkürztes Y-Chromosom. Colcemidbehandelt und orceingefärbt.

Abb. 8. (A, B) Hypotetraploide Chromosomensätze der Sublinie 1_{b25° . C_{1b25° = atypisches Chromosom. X = X-Chromosom, Y = Y-Chromosom. Colcemidbehandelt und orceingefärbt.

Abb. 9. (A, B) 'Tetraploide' Chromosomensätze der Sublinie 2. Man beachte, dass 9 grosse Autosomen vorhanden sind. Das einzige Y-Chromosom (Y) ist verkürzt. X = X-Chromosom. (C) Oktoploider Satz der Sublinie 2 mit 16 grossen Autosomen und 8 vierten Chromosomen. Colcemidbehandelt und orceingefärbt.

Stammlinie 1 b deutlich, ist sie doch hypotetraploid ($4n - 1$, Tab. 4). Wohl sind 8 grosse metazentrische Chromosomen vorhanden, jedoch wiederum nur je ein typisches X- und ein möglicherweise leicht verkürztes Y-Chromosom. Ein nicht identifizierbares atypisches Chromosom ($C_{1b\ 25}$) ist immer vorhanden, unterscheidet sich aber deutlich von C_{1a} und C_{1b} , da es nicht ypsilonförmig ist. Die vierten Chromosomen sind in zwei- bis vierfacher Anzahl vorhanden.

Sublinie 2 (Abb. 9 A–B; Tab. 4). Diese Linie ist 'tetraploid', das heisst, es sind wohl meist 16 Chromosomen vorhanden, aber eine genaue Analyse ergibt, dass keine echte Euploidie vorliegt: 8 grosse metazentrische Autosomen sind meist deutlich erkennbar; ein zusätzliches neuntes ist nur selten bei starker Quetschung als solches ansprechbar und dann von den anderen metazentrischen Autosomen nicht mehr zu unterscheiden (Abb. 9 B). Wiederum ist nur ein X- und ein verkürztes Y-Chromosom vorhanden. Allen Sätzen ist ein als C_2 bezeichnetes atypisches Chromosom gemeinsam, das eine ähnliche Ypsilonform aufweist wie C_{1a} und C_{1b} . Die vierten Chromosomen sind in Drei- oder Vierzahl vorhanden. Abb. 9 C zeigt einen der wenigen analysierbaren oktoploiden Sätze. Er ist hypoploid und zählt nur 30 statt 32 Chromosomen. Es handelt sich hier also nicht um eine identische Verdoppelung eines 'tetraploiden' Satzes, denn dazu fehlten ihm noch zwei metazentrische Autosomen. Ein zweiter vollständig analysierbarer oktoploider Satz zeigte dieselben Verhältnisse.

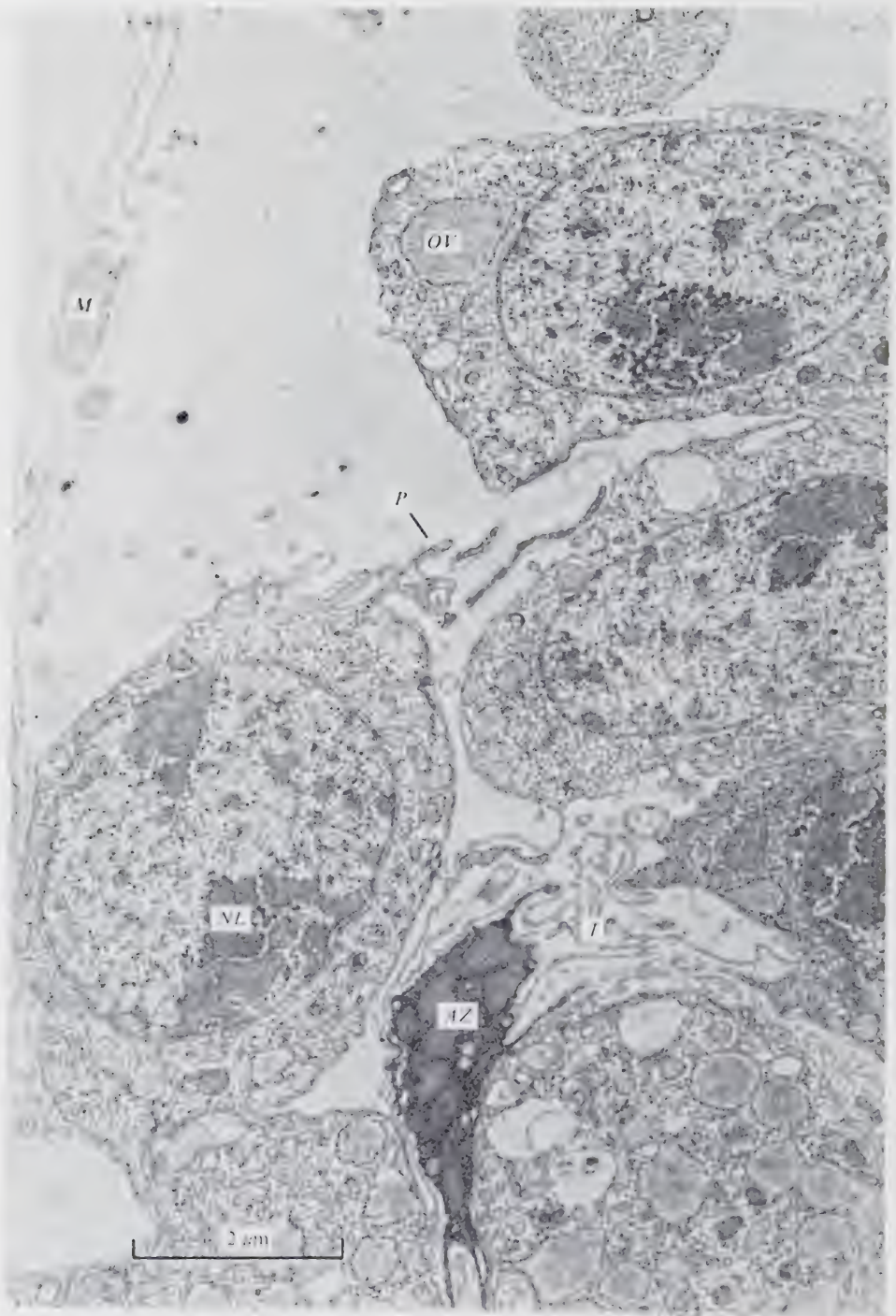
V. Ultrastruktur der Neoplas mazellen

Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Sublinien 1 a, 1 b und 2. Da sich zwischen diesen Sublinien, ausgenommen von Membranspezialisierungen bei Sublinie 2, keine eindeutigen ultrastrukturellen Unterschiede feststellen liessen, werden sie gemeinsam beschrieben.

Zellkontakt und Membranspezialisierungen. Der Kontakt zwischen den einzelnen Zellen ist in Übereinstimmung mit den histologischen Resultaten vor allem im peripheren Bereich des Implantates gering (Abb. 10), im Implantatsinnern etwas stärker (Abb. 11). Die häufig auftretenden Protuberanzen des Zytoplasmas (Abb. 10, Abb. 11) ergeben nie eine echte Verfingerung zwischen Nachbarzellen. In den oft beträchtlichen interzellulären Räumen findet man schlierenartiges, amorphes Material (Abb. 10). An Kontaktstellen zwischen Neoplas mazellen ist die Zytoplasmamembran wellig (Abb. 16 A) und ihr Verlauf nicht immer deutlich erkennbar. Nur in Sublinie 2 wurden sehr selten septate Desmosomen und *Zonulae adhaerentes* Abb. 14 B) gefunden. Insofern scheint sich also Sublinie 2 von den beiden anderen Sublinien zu unterscheiden. Nur in einem Fall wurde eine zweikernige Zelle angeschnitten.

Ribosomen und ER. In den meisten Zellen sind Ribosomen reichlich vorhanden (Abb. 14 B, 17, 18 A). Das ER ist spärlich ausgebildet und vorwiegend glatt (Abb. 12), nur selten rauh.

Golgi, Vesicles, Multivesicular Bodies. Es sind ein bis zwei vesikuläre Golgi-körper je angeschnittener Zelle zu finden.



ABBILDUNGSTEXT 10

Marginaler Implantatsbereich mit locker assoziierten Neoplas mazellen. AZ = abgestorbene Zelle, I = interzelluläres Material, M = Muskulatur des Wirtes, NL = Nukleolus, OV schwach osmophile Vakuole, P = Protuberanzen des Zytoplasmas.

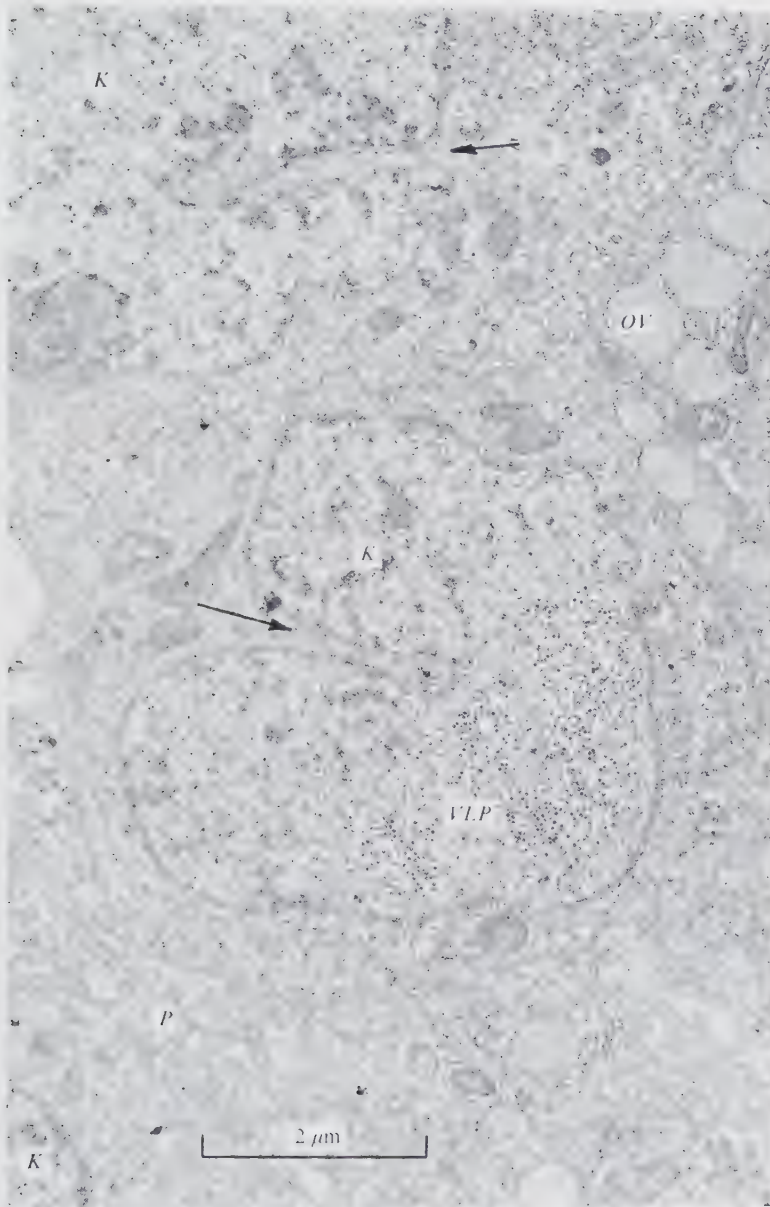
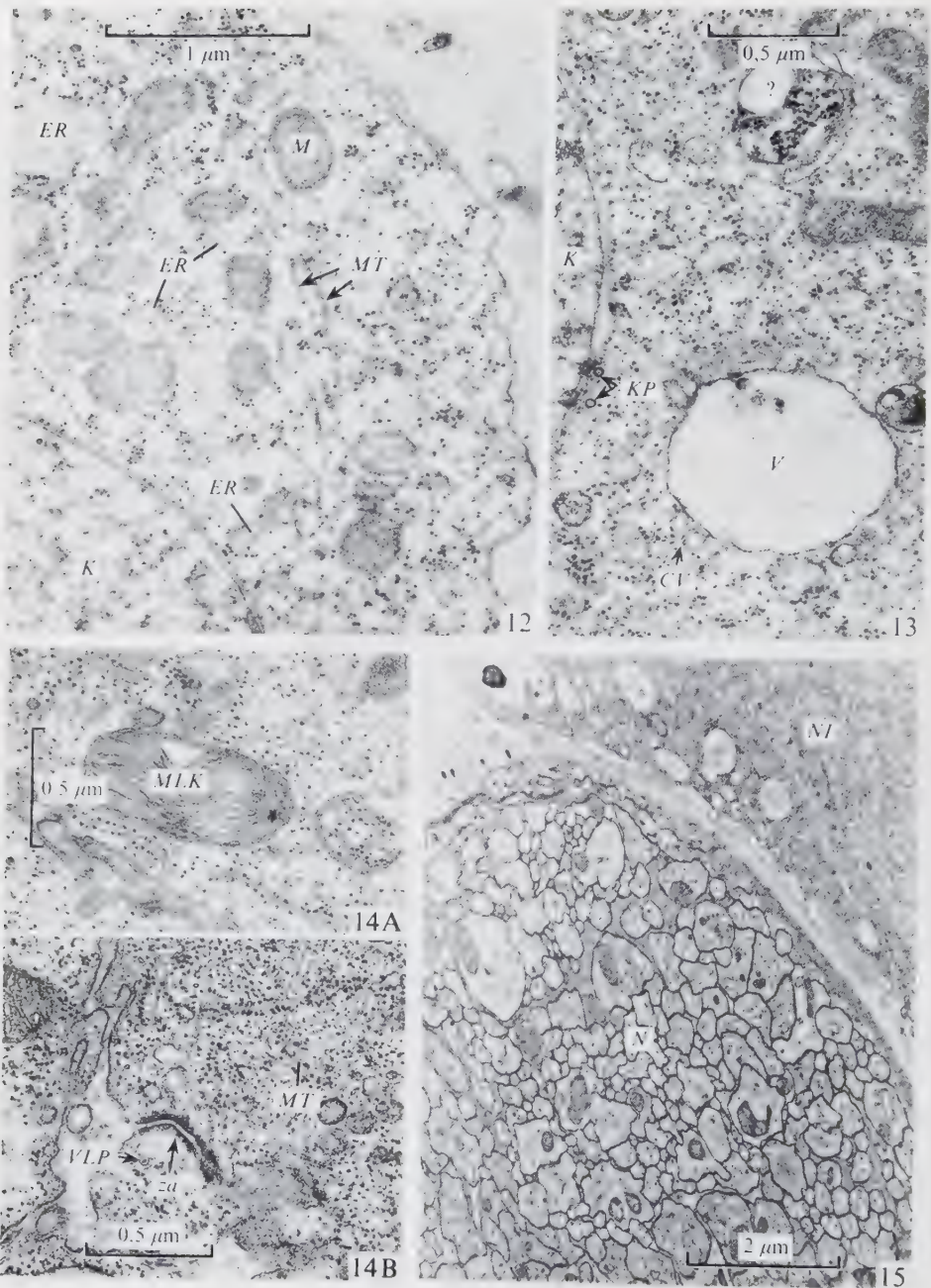


Abb. 11. Zentraler Implantatsbereich. *K* = Zellkern, *OV* = schwach osmophile Vakuole, *P* = Protuberanzen des Zytoplasmas, *VLP* = 36 nm *virus-like particles* im Zellkern. Pfeile geben Einbuchtungen in Kernmembran an.



ABBILDUNGSTEXTE 12-15

Abb. 12. Zytoplasmaausschnitt einer Neoplas mazelle. *ER* = glattes endoplasmatisches Retikulum, *M* = Mitochondrium, *MT* = Mikrotubuli, *K* = Zellkern. Man beachte die freien Ribosomen.

Abb. 13. Zytoplasmaausschnitt einer Neoplas mazelle. *CV* = coated vesicle, *K* = Zellkern, *KP* = Kernporen, *V* = Vakuole, ? = unbekannter Einschluss, wahrscheinlich ein Abbauprodukt.

Abb. 14. (A) Multilamellärer Körper (*MLK*) im Zytoplasma einer Neoplas mazelle. (B) Membranspezialisierung (*za* = zonula adherens) der Sublinie 2. *MT* = Mikrotubuli, *VLP* = 36 nm virus-like particles mit zentralem core im Zytoplasma. Man beachte die zahlreichen Ribosomen.

Abb. 15. Nerv (*N*) in einem Neoplas maimplantat (*NI*).

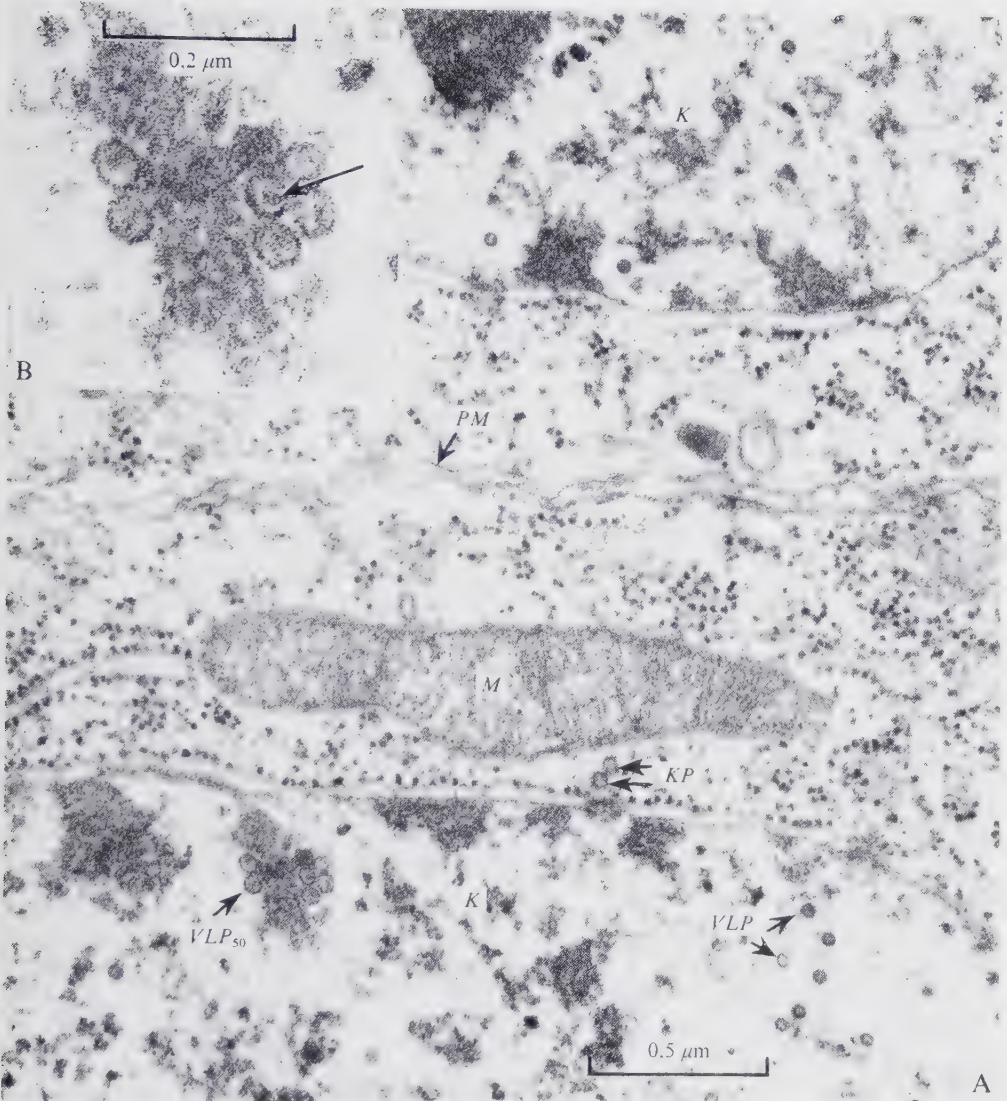
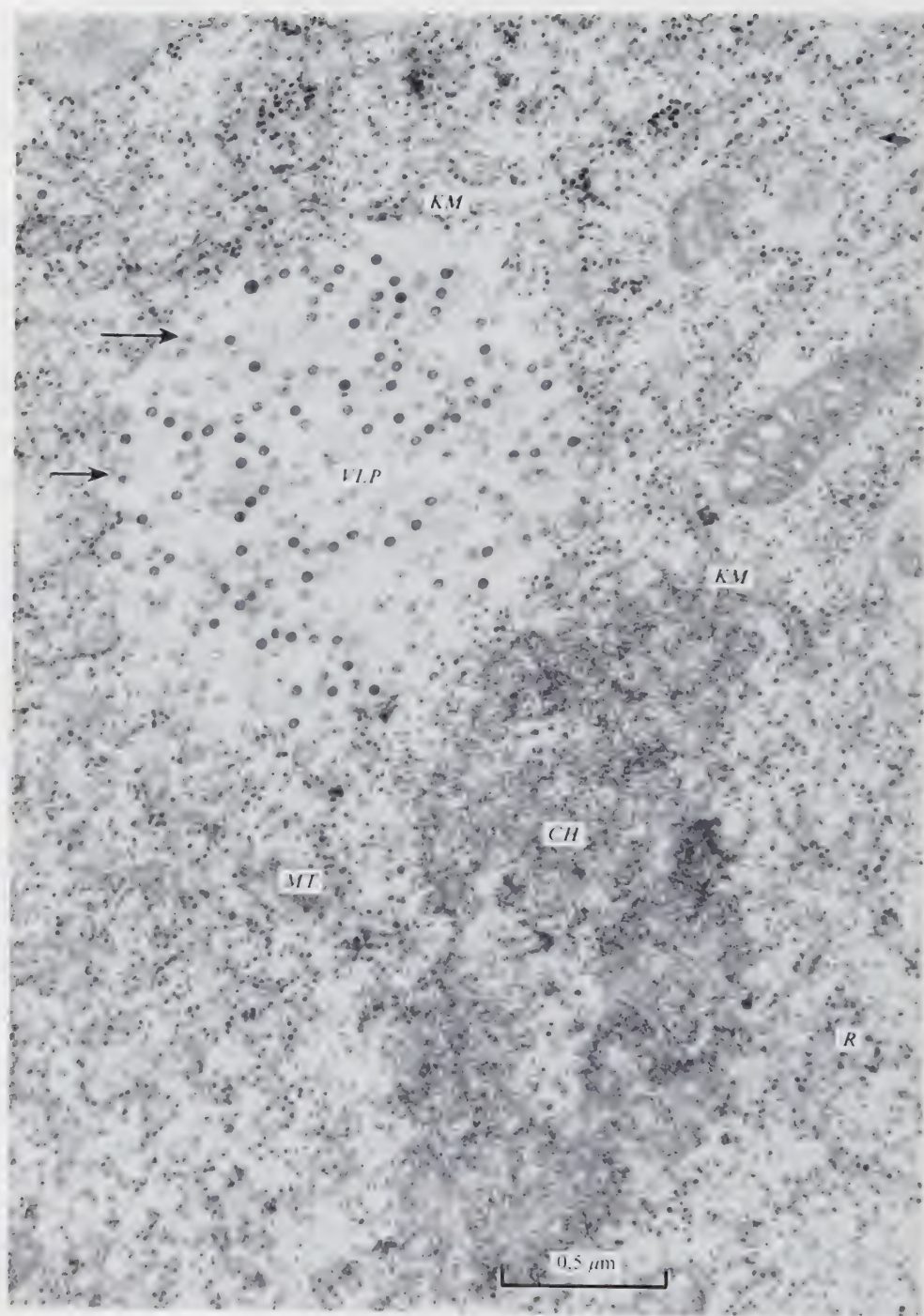


Abb. 16. (A) Ausschnitt zweier benachbarter Neoplasmazellen. *K* = Kern, *KP* = Kernporen, *M* = Mitochondrium, *PM* = wellige Plasmamembran, *VLP* = 36 nm virus-like particles, *VLP*₅₀ = 50 nm virus-like particles. (B) Vergrößerter Ausschnitt: 50 nm VLP mit hexagonalem Kapsid und elektronendichtem *core* (Pfeil).

Coated vesicles (Abb. 13) und *multivesicular bodies* sind vorhanden.

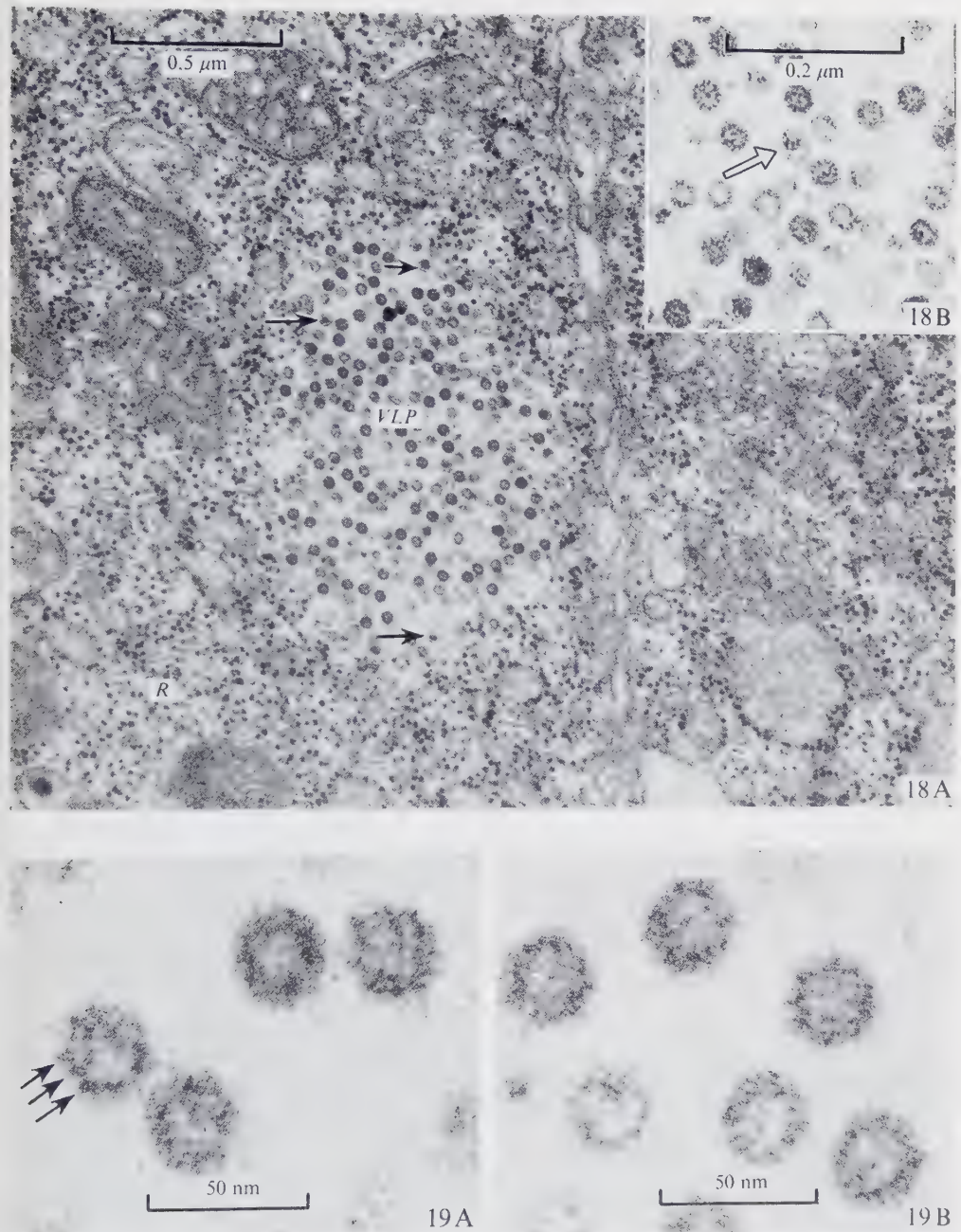
Mitochondrien. Diese sind oval (Abb. 12) bis wurstförmig (Abb. 16A). Verzweigte Mitochondrien kommen vor.

Mikrotubuli. Im Zytoplasma kommen diese häufig vor (Abb. 14B), meist unorientiert, seltener in gleicher Richtung assoziiert (Abb. 12). Vielfach verlaufen



ABBILDUNGSTEXT 17

Neoplas mazelle in Teilung. *CH* = Chromatin, *MT* = Mikrotubuli (wahrscheinlich Spindel). *KM* = desintegrierte Kernmembran, *R* = Ribosomen, *VLP* = 36 nm virus-like particles, gelegentlich mit zentralem core (Pfeile).



ABBILDUNGSTEXTE 18, 19

Abb. 18. (A) 36 nm virus-like particles (VLP) im Zytoplasma einer Neoplasma-Zelle, gelegentlich mit zentralem core (Pfeile). R = Ribosomen. (B) Vergrößerter Ausschnitt. Hexagonales 36 nm VLP (Pfeil).

Abb. 19. Morphologisch identische 36 nm VLP aus (A) Malpighischen Gefäßen eines 10 Tage alten Kontrolltieres ohne Neoplasma-implantat und (B) aus einer Neoplasma-Zelle. Pfeile bezeichnen Untereinheiten.

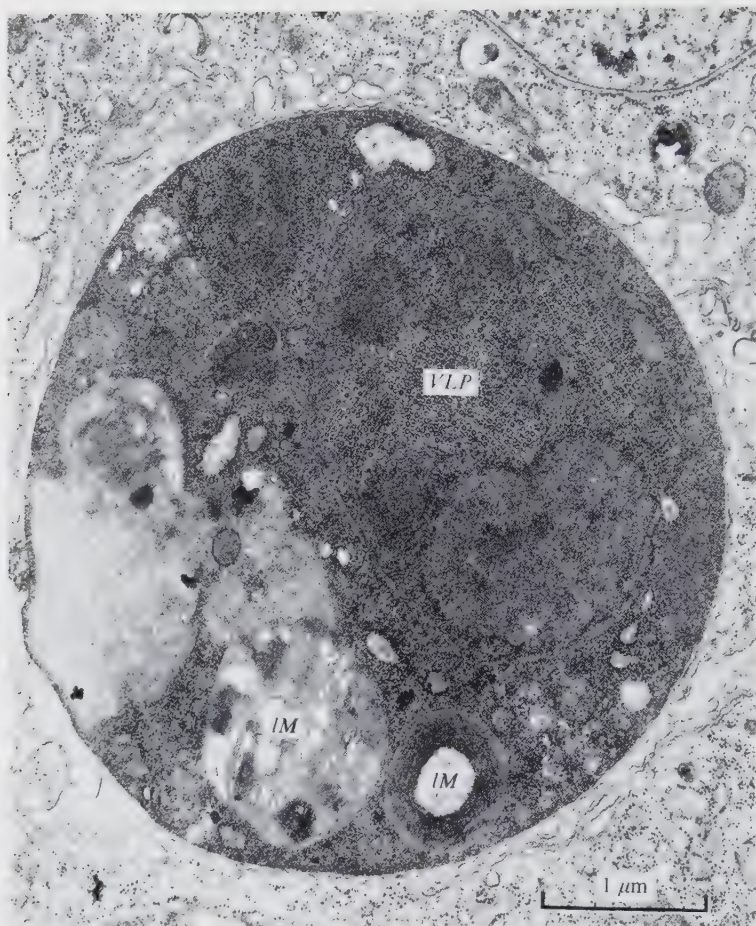
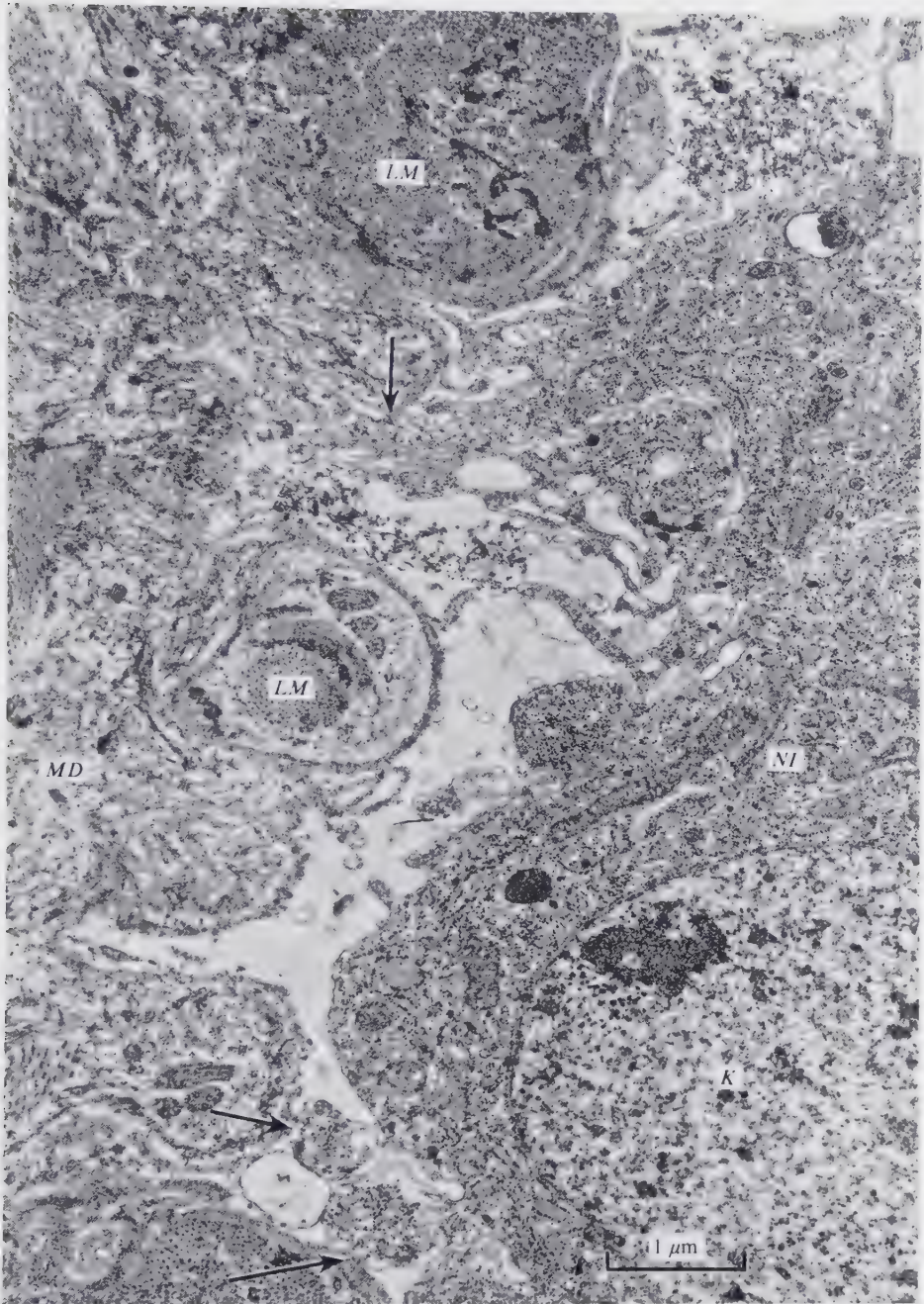


Abb. 20. Abgestorbene Neoplas mazelle mit kristallin angeordneten 36 nm VLP im Kern; IM = lamelläres Material im Zytoplasma.

sie parallel oder tangential zur Kernmembran, gelegentlich sind sie auch in Kerneinbuchtungen zu sehen (Abb. 11).

Zytoplasmatische Einschlüsse. Das Zytoplasma enthält verschiedene, oft nicht eindeutig zu klassifizierende Einschlüsse. Häufig vorhanden sind leicht osmophile, von einer einfachen Membran umgebene, meist rundliche Vakuolen (Abb. 10, 11). Da diese in absterbenden Zellen sehr häufig sind, handelt es sich möglicherweise um gequollenes ER. Seltener zu finden sind leicht osmophile, runde Vakuolen ohne umgebende Membran, die den von Poodry & Schneiderman (1970) und Wehman (1969 *a, b*) beschriebenen Lipideinschlüssen gleichen. Daneben sind multilamelläre Körper (Abb. 14A) vorhanden, die gelegentlich noch granuläre Einschlüsse – möglicherweise ursprünglich Ribosomen – enthalten (Abb. 13).

Zellkern. Der Kern ist rund bis oval und zeigt oft Einbuchtungen in der



ABBILDUNGSTEXT 21

Kontakt zwischen querschnittenem Mitteldarm (MD) und Neoplasma-implantat (NI). Besonders enge Kontaktstellen sind mit Pfeilen markiert. K = Kern einer Neoplasmazelle. LM = Längsmuskulatur des Mitteldarmes.

Kernmembran (Abb. 11). Die Nukleolen sind meist kompakt und messen maximal die Hälfte des angeschnittenen Kerndurchmessers.

Viruslike particles (VLP). Es wurden zwei Typen von VLP gefunden. In fast allen Zellen trifft man runde bis leicht ovale, oft leere VLP mit einem Durchmesser von durchschnittlich 36 nm. Sie kommen vorwiegend intranukleär, einzeln (Abb. 16A) oder in losen bis partiell kristallinen Haufen vor (Abb. 11, 17), aber auch im Zytoplasma (Abb. 18A). In solchen Ansammlungen erkennt man auch VLP mit einem dichten zentralen *core*, die gelegentlich hexagonale Form aufweisen (Abb. 18B). Auf den 6-eckkanten können im Idealfall 3 Untereinheiten erkannt werden (Abb. 19A), so dass unter Annahme einer Ikosaederform für diese VLP insgesamt 42 Untereinheiten das Kapsid aufbauen würden nach der entsprechenden Formel von Horne & Wildy (1961). Da Gartner (1971), allerdings nach ^{60}Co - γ -Bestrahlung, Grössenunterschiede zwischen nukleären und zytoplasmatischen VLP in Mitteldarmzellen von *Drosophila melanogaster* gefunden hat, wurde auch hier diesem Kriterium besondere Beachtung geschenkt, doch liessen sich keine Grössenunterschiede feststellen. Nur einmal wurde ein zweiter Typ von VLP von durchschnittlich 50 nm Grösse und hexagonaler Form in einem Zellkern als kleiner Haufen gefunden und zwar in engem Kontakt mit einer elektronendichten Kernkomponente (Chromatin?) (Abb. 16A–B). Diese VLP zeigten ebenfalls einen dichten zentralen *core*.

Tote Zellen. Eine tote Zelle manifestiert sich als ein in Bläschen aufgelöster Komplex oder als stark osmophiler kompakter Komplex mit grossen Vakuolen und lamellenartig eingelagertem Material im Zytoplasma sowie vielen meist kristallin angeordneten VLP (Abb. 20). Stark osmophiles, lamellenartig eingelagertes Material findet man gelegentlich auch in sonst (noch?) nicht degenerierten Zellen.

Wirtselemente im Neoplasmaimplantat. Häufigste Wirtselemente sind Tracheolen; selten wurden auch Nerven angeschnitten (Abb. 15).

Zellkontakt zu Darm. Der lichtmikroskopisch festgestellte enge Kontakt zwischen Neoplasmaimplantat und Darm kann bestätigt werden (Abb. 21). Dabei lässt sich an besonders engen Kontaktstellen der Verlauf der Plasmamembran gelegentlich nur mit Mühe noch eindeutig verfolgen.

DISKUSSION

I. Invasivität, Wirtsschädigung, Wirtstod

Das hier untersuchte Neoplasma vermag die peritoneale Schicht – die äussere Begrenzung der Ovarien – zu durchdringen. Dabei ist wichtig zu wissen, dass in der Mehrzahl der Fälle beide Ovarien attackiert sind, was mögliche transplantationsbedingte Verletzungen der peritonealen Schicht als einzige Ursache dieser Invasion ausschliesst, denn bei lateraler Implantation ins Abdomen wird höchstens das näherliegende Ovar verletzt. Dennoch ist es denkbar, dass die dünne peritoneale Schicht *in situ* gelegentlich schon Löcher aufweist, so dass

die Invasion begünstigt würde. Die in den Voruntersuchungen (Hadorn & Schubiger, 1969) gemachte Feststellung, dass die Neoplas mazellen auch in die Eifollikel einbrechen, konnte nicht bestätigt werden; im Ovarioleninnern wurden diese Zellen nie gefunden.

Der schädigende Einfluss des Neoplasmas aufs Wirtsovar manifestiert sich in der Eiablage, die bereits 5 Tage nach Injektion eines Neoplasmafragmentes beeinträchtigt wird. Ob diese Schädigung dadurch zustande kommt, dass Stoffwechselprodukte der Neoplas mazellen die für die Vorwärtsbewegung der Eier verantwortliche peritoneale und epitheliale Schicht lähmen, oder dass die invadierten und im extraovariolaren Raum proliferierenden Zellen lediglich einen Druck auf die Ovariolen ausüben, und deshalb die Eier nicht ins Ovidukt gelangen können, lässt sich nicht entscheiden.

Eine Invasion von Neoplas mazellen ins Darmsystem kann histologisch und autoradiographisch ausgeschlossen werden. Immerhin besteht zwischen Darmkanal und Neoplas mazellen oft eine engere Bindung als zwischen benachbarten Neoplas mazellen selbst.

Ob die implantatsbedingte Reduktion des Wirtsfettkörpers ursächlich korreliert ist mit der Anreicherung von Hämolymphe im Abdomen und damit Ursache für den Wirtstod, ist unbekannt.

II. Veränderung des Karyotyps in Dauerkultur

1. Identifizierung der atypischen Chromosomen

Die Tatsache, dass in gequetschten *Drosophila*zellen, die zuvor hypotonisch behandelt wurden, heterochromatische Regionen von Schwesterstrangchromatiden nahe beisammenliegen, währenddem euchromatische Regionen die Tendenz zeigen, auseinanderzuweichen (Moore, 1971), bietet eine wichtige Hilfe bei der Identifizierung atypischer Chromosomen. Dies gilt aber nur bei starker Quetschung. Die ypsilonförmigen Chromosomen C_{1a} , C_{1b} und C_2 bestehen demnach aus einem Hetero- und einem Euchromatin-Anteil. Da bei den Sublinien 1a und 2 gleichzeitig ein *X*- und ein *Y*-Chromosom fehlen, und bei Sublinie 1b ein *X*-Chromosom fehlt sowie eines der beiden *Y*-Chromosomen verkürzt ist, dürften diese atypischen Chromosomen aus *X*- und *Y*-chromosomalem Material bestehen (Translokation). Partielle Translokationen des *Y*-Chromosoms ans *X*-Chromosom wurden auch bei *in vitro* Dauerkulturen von Embryonen beobachtet (Dolfini, 1971). Das atypische Chromosom C_{1b25} ist möglicherweise aus dem atypischen, ypsilonförmigen Chromosom C_{1b} entstanden. Die morphologische Ähnlichkeit der Chromosomen C_{1a} , C_{1b} und C_2 erweckt den Eindruck, ein solch ypsilonförmiges Chromosom sei schon vor dem Aufspalten der Stammlinie H 126 in die Sublinien 1 und 2 entstanden, also vor der 5. Transfergeneration. Dies trifft aber nicht zu, denn in der 6. bis 8. Transfergeneration unterschieden sich Sublinie 1 und 2 noch nicht.

Das Chromosomenfragment der Sublinie 1b kann nicht genau identifiziert werden, doch handelt es sich möglicherweise um ein abnormes *X*-Chromosom.

2. Selektion von tetraploiden, aneuploiden Chromosomensätzen

Das Neoplasma H 126 hat sich, ausgehend von einem euploiden Gewebe, das in der 6. bis 8. Transfergeneration aus diploiden, tetraploiden und höherploiden Zellen bestand, während vierjähriger Kulturdauer in ein je nach Sublinie verschieden aneuploides, vorwiegend hypo- oder hypertetraploides Gewebe entwickelt, das keine diploiden Zellen mehr aufweist. Daneben sind aber immer auch höherploide Zellen vorhanden. Mit zunehmender Kulturdauer sind also bei diesem Gewebe ähnliche Aneuploidisierungseffekte aufgetreten wie sie bei *in vitro* Kulturen von *Drosophila*-Embryonen vielfach schon nach wenigen Stunden bis Tagen festgestellt wurden (Dolfini & Gottardi, 1966; Gvozdev & Kakpakov, 1970; Kakpakov, Polukarova & Gvozdev, 1971; Barigozzi, 1971). Dies ist bemerkenswert, bietet doch die adulte Leibeshöhle von *Drosophila*-Weibchen nicht nur ein ideales Milieu für die Embryonenentwicklung (Hadorn *et al.* 1968), sondern auch für Langzeitkulturen von Imaginalscheiben, in denen nach 4-jähriger Kulturdauer fast keine chromosomalen Veränderungen festgestellt wurden (Remensberger, 1968).

In den Sublinien des Neoplasmas H 126 sind die Geschlechtschromosomen neben den vierten Chromosomen strukturell wie auch numerisch am instabilsten, doch findet man in zwei Sublinien auch je ein zusätzliches grosses metazentrisches Autosom, was bei diploiden *in vitro* Kulturen von *Drosophila*-Embryonen wegen Störung der Genbalance 'unvereinbar mit Zellwachstum' (Mosna & Dolfini, 1972) ist. In den 'tetraploiden' Zellen des Neoplasmas H 126 stört offenbar eine geringe numerische Variation der Hauptautosomen die Genbalance nicht entscheidend.

Als Ursache für die Selektion von aneuploiden Karyotypen im Neoplasma H 126 sind folgende Mechanismen denkbar: (1) Bessere Anpassung aneuploider Karyotypen an veränderte physiologische Bedingungen, die bei der starken Proliferation des Implantates im Adultwirt entstehen. (2) Zufällige, transplantationsbedingte Selektion aneuploider Implantatsregionen. Eine milieubedingte Selektion aneuploider Karyotypen hat Gottardi (1967) unter limitierenden Bedingungen bei *in vitro* Kulturen ausgehend von *Drosophila*-Embryonen festgestellt, währenddem Mosna & Dolfini (1972) als Grund für die karyologische Verschiedenheit ihrer embryonalen *in vitro* Kulturen, die unter identischen Bedingungen gewachsen sind, eine 'zufällige Auswahl' postulieren. Da sich die Sublinien des Neoplasmas H 126 chromosomal in numerischer wie auch in struktureller Hinsicht eindeutig unterscheiden, obwohl sie unter identischen Bedingungen gewachsen sind (mit Ausnahme von 1b₂₅₊), kann man eine transplantationsbedingte Selektion aneuploider Karyotypen annehmen.

Über die chromosomale Stabilität des abnormen Gewebes H 126 in zeitlicher Hinsicht lässt sich lediglich sagen, dass die Sublinien 1a, 1b und 2 während der 6 Transfergenerationen (= 84 Tage bei 18 °C), über die sich die Untersuchungen nach 4-jähriger Kulturdauer erstreckten, konstant blieben, dass sich andererseits

aber die beiden Sublinien 1b und 1b₂₅ spätestens nach 43 Transfergenerationen (= 502 Tage bei 18 °C für Sublinie 1b) nach ihrer Trennung chromosomal deutlich voneinander unterscheiden. Damit ist dieses neoplastische Gewebe chromosomal weniger konstant als atelotypische Gewebelinien ausgehend von Imaginalscheiben in Dauerkultur (Remensberger, 1968).

Dass polyloide Zellen schon ursprünglich im Neoplasmagewebe vorhanden waren, ist nicht auszuschliessen, hat doch Barigozzi (1971) gezeigt, dass in 6 h alten Embryonen verschiedener *Drosophila melanogaster*-Stämme bereits *in situ* aberrante, inklusive polyloide Karyotypen vorkommen müssen. Demnach ist es also durchaus möglich, dass in der 6. bis 8. Transfergeneration, in denen zum erstenmal Chromosomenuntersuchungen angestellt wurden, noch ein mehr oder weniger ursprüngliches Karyotypenmuster vorhanden war. Dass diploide und tetraploide Zellen im gleichen Gewebe einen fast gleichen Zellzyklus aufweisen können, haben Friedberg & Davidson (1970) für mixoploide Meristeme von *Vicia faba* gezeigt.

III. Sind virus-like particles pathogen?

Die 36 nm grossen VLP aus H 126 Neoplas mazellen sind in ihrer Form und Grösse identisch mit denjenigen, die ich auch in Malpighischen Gefässen und im Mitteldarm von 10 d alten adulten Kontrolltieren gefunden habe (Abb. 19), mit dem Unterschied, dass sie dort vorwiegend in kristalliner Anordnung vorkommen, währenddem dies in Neoplas mazellkernen nur selten der Fall ist. Sie entsprechen damit auch jenen virusähnlichen Partikeln, die in fast allen Gewebetypen von *Drosophila melanogaster* gefunden wurden (Ursprung, 1972). Die Virusmorphologie stimmt mit derjenigen überein, die Wehman & Brager (1971) für VLP in Imaginalscheibenkulturen *in vitro* beschrieben haben.

Es ist bereits bekannt, dass diese VLP in adultem *Drosophila*-gewebe *in situ* mit dem Alter der Fliege zunehmen (Herman, Johnson & Miquel, 1971; Philpott, Weibel, Altan & Miquel, 1969; Miquel, Bensch & Philpott, 1972). Durch ⁶⁰Co-γ-Bestrahlung kann dieser Effekt noch verstärkt werden (Gartner, 1971). In kultivierten Imaginalscheibengeweben vermehren sich diese VLP mit zunehmender Kulturdauer, dies sowohl *in vivo* (Akai, Gateff, Davis & Schneiderman, 1967), als auch *in vitro* (Wehman & Brager, 1971). Über mögliche virusbedingte cytopathische Veränderungen können aber lediglich Mutmassungen angestellt werden, so lange ein Infektionstest immer noch aussteht. Immerhin spricht das gewebeunspezifische, häufige Vorkommen der 36 nm VLP *in situ* eher gegen eine ursächliche Beteiligung an der Entstehung dieses Neoplasmas.

Die hier nur einmal gefundenen 50 nm grossen VLP entsprechen möglicherweise den 50 nm Partikel, die Felluga, Jonsson & Liljeros (1971) in Zellkernen von larvalem Fettkörper der Mutante bobbed gefunden haben. Diese VLP könnten durchaus bei einem Gewebetransfer von aussen her eingeschleppt worden sein, da ja nicht unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde.

Tab. 5. Vergleich des Neoplasmas H 126 mit dem Neuroblastom der Mutante $l(2)gl^4$ (Gateff & Schneiderman, 1969)

Vergleichskriterien	Neoplasma H 126	Neuroblastom $l(2)gl^4$
Ausgangsmaterial	6 h alte Hinterhälfte eines Wildtypembryos	Hirn aus 10 h altem Embryo oder aus Larven aller Stadien der Mutante $l(2)gl^4$
Wachstum im Adultwirt	sehr stark	sehr stark
Gewebekonsistenz	lockere Zellmassen	lockere Zellmassen
Zelltypen in Adultkultur	ursprüngliche Zahl unbekannt	3
Invadiert	Ovarien	Ovarien, Darm, Fettgewebe
Differenzierungsfähigkeit	keine	keine
Ultrastruktur		
Mitochondrien	oval, wurstförmig oder verzweigt	rund bis oval
Protuberanzen des Zytoplasmas	viele	wenige
ER	glatt, seltener rauh	nur glatt

IV. Ursprung des Neoplasmas H 126

Die komplexen Bedingungen bei der Entstehung dieses abnormen Gewebes erschweren Aussagen über seine histologische Herkunft. Insbesondere ist unklar, ob es sich tatsächlich um ein schon im embryonalen Stadium entstandenes Neoplasma handelt. Wohl war die Hinterhälfte eines Wildtypembryos das Ausgangsmaterial für die Gewebekultur, indes erreicht ein solches in die adulte Leibeshöhle implantiertes Embryofragment nach 14-d Kulturdauer das Stadium einer verpuppungsreifen Larve wie auch die Metamorphosekompetenz (Hadorn *et al.* 1968). Als potentiellcs Ursprungsmaterial kommen demnach nicht nur embryonale, sondern auch larvale und imaginale Blasteme in Frage. Von den imaginalen Primordien kann man nur thorakale und abdominale erwarten, da bei 6 h alten *Drosophila*-Embryonen ektodermale Imaginalanlagen längs der Körperachse bereits regionsspezifisch determiniert sind (Hadorn *et al.* 1968). Larvales Gewebe als Ursprung für dieses Neoplasma scheint wenig wahrscheinlich, denn die meisten larvalen Zellen sind ja polytän und wachsen ohne Zellteilung.

1. Vergleich des Neoplasmas H 126 mit dem Neuroblastom der Mutante $l(2)gl^4$ in Adultkultur (Gateff & Schneiderman, 1969)

Tab. 5 zeigt, dass sich diese beiden Gewebe in ihrem Verhalten in Adultkultur gleichen. Es ist auch durchaus denkbar, dass das Neoplasma H 126 von Neuroblasten abstammt, denn im 6 h alten *Drosophila*-Embryo, im Stadium der Keimstreifenverlängerung, erstreckt sich das Neuroblastenmaterial auch noch in die embryonale Hinterhälfte. Ultrastrukturelle Unterschiede in Mito-

chondrienform, Zellprotuberanzen und das Vorkommen von rauhem ER sprechen allerdings gegen eine solche Abstammung.

2. Ist das Neoplasma H 126 ein Derivat imaginaler Primordien?

Zwischen Neoplasma H 126 und epithelialen Imaginalscheibenzellen des späten 3. Larvenstadiums bestehen weitgehende ultrastrukturelle Ähnlichkeiten, abgesehen vom verminderten Zellkontakt und vom damit verbundenen Verlust der histologischen Organisation. Übereinstimmend sind insbesondere folgende Zellorganellen (Ursprung, 1972): Wenig und dann vorwiegend glattes ER, seltener rauhes ER, viele freien Ribosomen, das Vorkommen von Lipidtropfen, vesikuläre Form des Golgiapparates, das Vorkommen von *multivesicular bodies*, viele Mikrotubuli und die verschiedenen Mitochondrienformen (Poodry & Schneiderman, 1970). Vergleichbare lamelläre Einschlüsse im Zytoplasma – wahrscheinlich Abbauprodukte – fand Wehman (1969 *a, b*) bei einwöchigen *in vivo* Kulturen, ausgehend von 115 und 120 h alten Flügelimaginalscheiben.

Aus diesen Gründen neige ich zur Ansicht, dass das Neoplasma H 126 ein Derivat imaginaler Primordien ist. Die zytoplasmatischen Protuberanzen liessen sich dann als abnorme Mikrovilli interpretieren.

V. Versuch einer Klassifizierung des Neoplasma H 126

Gateff & Schneiderman (1969) haben festgestellt, dass sich Vertebraten- und Insekten-Neoplasmen in bezug auf folgende Hauptcharakteristika ähnlich sind: (1) Schnelles Wachstum *in situ* wie auch während *in vivo* Kultur, (2) Wiederholte Transplantierbarkeit, (3) Invasivität *in situ* und nach Transplantation, (4) Schwache Adhäsion der Zellen untereinander (Verlust der Organisation), (5) Letalität des Wirtes. Erfüllt ein Gewebe diese fünf Punkte, insbesondere Punkt (3), so wird es als invasives (*malignes*) Neoplasma bezeichnet. Anhand dieser Klassifizierung muss man das hier untersuchte abnorme, aus einem Embryo stammende Gewebe H 126 als *invasives Neoplasma* bezeichnen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das hier beschriebene Neoplasma H 126 wurde aus der Hinterhälfte eines 6 ± 1 h alten Embryos von *Drosophila melanogaster* in Adultkultur erhalten und während mehr als 120 Transfergenerationen (über 4 Jahre) in weiblichen Adultwirten kultiviert, wobei 4 Sublinien gezogen wurden.

2. Das Neoplasma H 126 invadiert die Ovarien des Wirtes, währenddem das Fettgewebe und das Darmsystem lediglich eng umspinnen werden. Es ist 8 bis 14 d nach abdominalen Implantation letal (Zuchttemperatur 25 °C).

3. Die Eiablage von Neoplasmawirten nimmt bereits 5 Tage nach Implantation stark ab (Zuchttemperatur 25 °C).

4. Nach vierjähriger Kulturdauer unterscheiden sich die 4 Sublinien chromosomal eindeutig voneinander; ihr Karyotyp liegt jedoch durchwegs im tetraploiden Rahmen.

5. Ultrastrukturelle Besonderheiten der Neoplasmazellen sind das weitgehende Fehlen

von Membranspezialisierungen, korreliert mit schwacher Zelladhäsion, viele Zytoplasma-protuberanzen und häufig vorkommende 36 nm grosse *viruslike particles*, sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma.

6. Invasivität, chromosomale Veränderungen, der Ursprung des Neoplasmas H 126 und das Vorkommen von *viruslike particles* werden diskutiert.

Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. E. Hadorn danke ich herzlich für die Leitung dieser Arbeit. Ebenso danke ich F. Schwegler für die fachkundige Einführung in die Elektronenmikroskopie, Dr. W. Brüscheiler für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und meiner Frau für Unterstützung in der Endphase der Arbeit.

LITERATUR

- AKAI, H., GATEFF, E., DAVIS, L. E. & SCHNEIDERMAN, H. A. (1967). Virus-like particles in normal and tumorous tissues of *Drosophila*. *Science, N.Y.* **157**, 810–813.
- BARIGOZZI, C. (1971). *Drosophila* cells *in vitro*: Behavior and utilization for genetic purpose. In *Arthropod Cell Cultures and Their Application to the Study of Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology* **55**, 209–219.
- BAUMANN, P. A. (1969). Untersuchungen zum Proteinstoffwechsel bei alternden Adultmännchen, Larven des Wildtyps und der Letalmutanten (ltr und lme) von *Drosophila melanogaster*. *Z. vergl. Physiol.* **64**, 212–242.
- DOLFINI, S. (1971). Cell culture of Diptera. In *Invertebrate Tissue Culture* (ed. C. Vago). New York and London: Academic Press.
- DOLFINI, S. & GOTTARDI, A. (1966). Changes of chromosome number in cells of *Drosophila melanogaster* cultured *in vitro*. *Experientia* **22**, 144–146.
- FELLUGA, B., JONSSON, V. & LILJEROS, M. R. (1971). Ultrastructure of new virus-like particles in *Drosophila*. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 339–346.
- FRIEDBERG, S. H. & DAVIDSON, D. (1970). Duration of S phase and cell cycles in diploid and tetraploid cells of mixoploid meristems. *Expl Cell Res.* **61**, 216–218.
- GARTNER, L. P. (1971). Two types of viruslike particles in *Drosophila* midgut. *Experientia* **27**, 562–564.
- GATEFF, E. (1971). *Developmental and histological studies of wild-type and mutant tissues of Drosophila melanogaster*. Dissertation, University of California, Irvine, U.S.A.
- GATEFF, E. & SCHNEIDERMAN, H. A. (1969). Neoplasms in mutant and cultured wild-type tissues of *Drosophila*. *Natn. Cancer Inst. Monogr.* **31**, 365–397.
- GOTTARDI, A. O. (1967). Karyotype selection in cultures with different initial cell concentrations (*Drosophila melanogaster*). *Second International Colloquium in Invertebrate Tissue Culture, Instituto Lombardo: Fondazione Baselli*, pp. 189–200.
- GVOZDEV, V. A. & KAKPAKOV, V. T. (1970). Establishment of female embryonic cell sublines of *D. melanogaster in vitro*. *Drosoph. Inf. Serv.* **45**, 110.
- HADORN, E. (1963). Differenzierungsleistung wiederholt fragmentierter Teilstücke männlicher Genitalscheiben von *Drosophila melanogaster* nach Kultur *in vivo*. *Devl Biol.* **7**, 617–629.
- HADORN, E. (1969). Proliferation and dynamics of cell heredity in blastema cultures of *Drosophila*. *Natn. Cancer Inst. Monogr.* **31**, 351–364.
- HADORN, E. & GARCIA-BELLIDO, A. (1964). Zur Proliferation von *Drosophila*-Zellkulturen im Adultmilieu. *Rev. suisse Zool.* **71**, 576–582.
- HADORN, E., HÜRLIMANN, R., MINDEK, G., SCHUBIGER, G. & SCHUBIGER, M. (1968). Entwicklungsleistung embryonaler Blasteme von *Drosophila* nach Kultur im Adultwirt. *Rev. suisse Zool.* **75**, 557–569.
- HADORN, E. & SCHUBIGER, G. (1969). An invasive neoplasm from embryonic cells of *D. melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.* **44**, 190.
- HERMAN, M. M., JOHNSON, M. & MIQUEL, J. (1971). Virus-like particles and related filaments in neurons and glia of *Drosophila melanogaster* brain. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 442–445.
- HORNE, R. W. & WILDY, P. (1961). Symmetry in virus architecture. *Virology* **15**, 348–373.

- KAKPAKOV, V. T., POLUKAROVA, L. G. & GVOZDEV, V. A. (1971). Stability and variability of karyotypes in sublines of *Drosophila melanogaster* embryonic cells cultivated *in vitro* for a long time. *Ontogenese* **2** (Moskau).
- KRISHNAKUMARAN, A., BERRY, S. J., OBERLANDER, H. & SCHNEIDERMAN, H. A. (1967). Nucleic acid synthesis during insect development. II. Control of DNA synthesis in the cecropia silkworm and other saturniid moths. *J. Insect. Physiol.* **13**, 1-57.
- LEWIS, E. & RILES, L. (1960). A new method of preparing larval ganglion chromosomes. *Drosoph. Inf. Serv.* **34**, 118.
- MIQUEL, J., BENSCH, K. G. & PHILPOTT, D. E. (1972). Viruslike particles in the tissues of normal and γ -irradiated *Drosophila melanogaster*. *J. Invertebr. Pathol.* **19**, 156-159.
- MOORE, CH. M. (1971). Ringlike configuration of nonring chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Genet. Cytol.* **13**, 164-166.
- MOSNA, G. & DOLFINI, S. (1972). Morphological and chromosomal characterization of three new continuous cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **38**, 1-9.
- PHILPOTT, D. E., WEIBEL, J., ALTAN, H. & MIQUEL, J. (1969). Viruslike particles in the fat body, oenocytes and central nervous tissue of *Drosophila melanogaster* imagoes. *J. Invertebr. Pathol.* **14**, 31-38.
- POODRY, C. A. & SCHNEIDERMAN, H. A. (1970). The ultrastructure of the developing leg of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux Archiv EntwMech. Org.* **166**, 1-44.
- REMENSBERGER, P. (1968). Cytologische und histologische Untersuchungen an Zellstämmen von *Drosophila melanogaster* nach Dauerkultur *in vivo*. *Chromosoma* **23**, 386-417.
- ROMEIS, B. (1968). *Mikroskopische Technik*. München und Wien: R. Oldenbourg.
- URSPRUNG, H. (1972). The fine structure of imaginal discs. In *The Biology of Imaginal Discs. Results and Problems in Cell Differentiation* **5**, Berlin: Springer.
- WEHMAN, H. J. (1969a). Fine structure of *Drosophila* wing imaginal discs during early stages of metamorphosis. *Wilhelm Roux Archiv EntwMech. Org.* **163**, 375-390.
- WEHMAN, H. J. (1969b). *Fine structure of the developing wing imaginal disc in Drosophila*. Dissertation, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- WEHMAN, H. J. & BRAGER, M. (1971). Viruslike particles in *Drosophila*: Constant appearance in imaginal discs *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 127-130.

(Received 26 June 1973, revised 25 September 1973)

Curriculum vitae

VON HANS-PETER HAURI, geboren am 13. Februar, 1945, in Zürich, Bürger vor Hirschthal, AG.

- 1958–1964 Gymnasium Freudenberg Zürich. Abschluss mit Matura Typus B.
- 1964 Immatrikulation an der Philosophischen Fakultät Zürich.
- 1969 Diplom in Zoologie
- 1969 Hilfslehrer an der Kantonsschule Zürcher Oberland, Wetzikon.
- 1969–1973 Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Hadorn.
In dieser Zeit war ich Forschungs- und Unterrichtsassistent am
Zoologischen Institut der Universität Zürich.

Während meines Studiums besuchte ich bei folgenden Dozenten Vorlesungen und Kurse.

Zoologie: H. Burla, H. Graber, E. Hadorn, W. Leuthold, F. Kurt, W. Sauter, P. Tardent, G. Wagner, R. Wehner, V. Ziswiler.

Entwicklungsbiologie und Genetik: P. S. Chen, W. Gehring, P. Munz, R. Nöthiger, H. Tobler, H. Ursprung.

Molekularbiologie und Biochemie: E. Kubli, M. Viscontini, Ch. Weissmann.

Cytologie und Elektronenmikroskopie: E. Jungen-Hauschteck, F. Schwegler.

Strahlenbiologie: H. Fritz-Niggli.

Anthropologie und Anatomie des Menschen: J. Biegert, G. Töndury.

Paläontologie: E. Kuhn-Schnyder, H. Rieber, R. Ziegler.

Botanik: F. Markgraf, D. Rast, O. Rohweder, A. Rutishauser, H. Schächli, B. Stüssi, E. Thomas, H. Wanner.

Chemie: H. R. Christen, A. Dreiding, C. H. Eugster, W. Ludwig, H. Schmid.

Mathematik und Statistik: E. Batschelet, H. Burla, P. Nüesch.

Printed in Great Britain at the University Printing House, Cambridge